



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0716812-8 A2



(22) Data de Depósito: 15/09/2007
(43) Data da Publicação: 05/11/2013
(RPI 2235)

(51) Int.Cl.:
A61K 31/70
A61K 38/16

(54) Título: PRO DROGAS POLIMERICAS
DIRECIONADAS CONTENDO LIGANTES
MULTIFUNCIONAIS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 15/09/2006 US 60/844,943

(73) Titular(es): Enzon Pharmaceuticals, Inc

(72) Inventor(es): Hong Zhao, Maria Belen Rubio, Prasanna Reddy

(74) Procurador(es): Angela Cristina Pinheiro Palmer

(86) Pedido Internacional: PCT US2007078600 de
15/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/034124de
20/03/2008

PRO DROGAS POLIMÉRICAS DIRECIONADAS CONTENDO LIGANTES MULTIFUNCIONAIS

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS

5 Este pedido de patente reivindica prioridade do pedido de patente US No. 60/844.943 depositado em 15 de setembro de 2006, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 Sabe-se que muitos dos agentes anti-câncer de baixo peso molecular apresentam toxidez significativa. Ao longo dos anos, varias tentativas de se reduzir a toxidez e melhorar a eficácia destes agentes anti-câncer de baixo peso molecular foram apresentadas.

15 Uma tentativa de se reduzir a toxidez e melhorar a eficácia destes agentes anti-câncer de baixo peso molecular foi direcionada a sistemas de transporte de drogas focada em agentes direcionadores. Por exemplo, o agente direcionador, tal como anticorpo de cadeia simples, peptídeos RGD ou ácido fólico, pode direcionar o transporte do agente terapêutico e melhorar seu efeito terapêutico. Ao mesmo tempo, o transporte direcionado de quimioterápicos muito potentes reduz sua toxidez. A estratégia foi validada, por exemplo, pela aprovação de Mylotarg[®] a gentuzumab zogamicina da Wyeth, um anticorpo humanizado
20 anti CD33 ligado a citotoxina caliqueamicina, para leucemia mieloide aguda (AML) pelo FDA.

Tradicionalmente, os imunoconjugados incluem três componentes: um agente direcionador tal como um anticorpo monoclonal, uma citotoxina e um ligante.

25 Entretanto, esta estratégia requer que o anticorpo mantenha um alto grau de sua afinidade de ligação a seu antígeno depois da conjugação com a droga. Mais ainda, os conjugados anticorpo-droga precisam ser estáveis em tampões ou plasma e não devem liberar a toxina prematuramente durante o trajeto. Eles precisam também ser internalizados considerando que o anticorpo se liga ao seu antígeno na superfície da célula. Mesmo assim, a molécula da droga precisa ser liberada intacta dentro da célula tumoral desejada numa
30 velocidade também desejada.

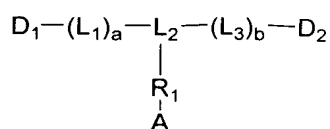
Anticorpos de cadeia simples (SCAs) ou anticorpos antígeno-ligantes de cadeia simples incluem o domínio de ligação de um anticorpo completo com apenas um quarto de

seu tamanho. Entretanto, SCA pode se ligar ao antígeno especificamente com alta afinidade. Uma descrição da teoria e da produção de proteínas antígeno-ligantes de cadeia simples pode ser encontrada, por exemplo, nas patentes US Nos. 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030 e 5.518.889. As proteínas antígeno-ligantes de cadeia simples produzidas pelos processos citados nos documentos de patente US acima citados possuem especificidade de ligação e afinidade substancialmente similar ao fragmento Fab correspondente, seus ensinamentos sendo aqui incorporados por referência. Mais recentemente, o documento de patente US No. 6.872.393 revelou polipeptídeos de cadeia simples de óxido de polialquilenos. Os ensinamentos de cada uma das patentes a seguir são aqui incorporados por referência.

A despeito das tentativas e avanços, ainda existe a necessidade de se prover sistemas de transporte poliméricos de drogas focados em agentes direcionadores tendo atividade terapêutica desejada e menor toxidez. A presente invenção se concentra nesta necessidade e em outras.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

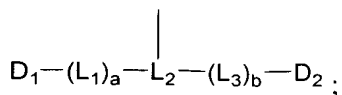
De modo a sobrepor os problemas acima mencionados e melhorar a tecnologia para transporte de drogas por polímeros, são providos compostos novos e vantajosos que empregam o uso de ambas as tecnologias de agente direcionador e PEGilação assim como técnicas terapêuticas melhoradas. Sendo assim, de acordo com um aspecto da presente invenção são providos compostos de Fórmula (I):



em que:

R_1 é um polímero hidrossolúvel substancialmente não-antigênico;

A é um grupo de proteção ou



cada D_1 é independentemente selecionado dentre porções direcionadoras, grupos funcionais e grupos de saída, preferencialmente porções direcionadoras;

cada D_2 é independentemente selecionado dentre porções biologicamente ativas, grupos funcionais e grupos de saída, preferencialmente porções biologicamente ativas;

cada L_1 é independentemente um ligante permanente ou um ligante lábil, preferencialmente um ligante permanente;

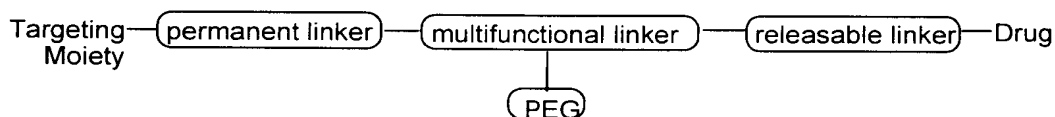
5 L_2 é um ligante multifuncional;

cada L_3 é independentemente um ligante permanente ou um ligante lábil, preferencialmente um ligante lábil; e

(a) e (b) são independentemente zero ou um número inteiro positivo, preferencialmente zero ou 1.

10 Em um aspecto da invenção, o resíduo polimérico é um óxido de polietileno que pode ser conjugado tanto a moléculas de droga pequenas quanto a anticorpos de cadeia simples (SCA) por meio de ligantes lábeis e ligantes permanentes por meio de ligantes multifuncionais. Desta maneira, são apresentados compostos que fornecem uma plataforma de transporte SCA-PEG-Ligante-Droga para encaminhamento direcionado de compostos
15 citotóxicos que são moléculas pequenas. Adicionalmente, é vantajoso que a carga de ambas molécula pequena e SCA por local de ligação sejam aumentados em comparação com os conjugados SCA-droga tradicionais. Assim, são apresentadas pro drogas SCA direcionadas que são custo-efetivas e de baixo custo. Mais ainda, as pro drogas da presente invenção proporcionam métodos para regulação da meia-vida de circulação das drogas, por exemplo,
20 com o aumento da meia-vida de circulação, quando desejado, através do uso de ligantes apropriados.

Em um aspecto geral da presente invenção, sem limitação, é descrito na estrutura abaixo:



25 onde: “targeting moiety” = porção direcionadora, “multifunctional linker” = ligante multifuncional, “releasable linker” = ligante lábil e “drug” = droga ,
em que PEG é ligado a ambos SCA e droga, tal como um agente citotóxico, por meio de um ligante multifuncional centralmente posicionado; o ligante com o SCA é permanente enquanto que o ligante com o agente citotóxico é lábil e pode ser configurado para ser estável
30 no sangue, mas facilmente degradado na presença de uma enzima sitio-específica.

Em um aspecto preferido, o SCA é ligado por meio de um ligante permanente tal como um contendo um grupo maleimida e o agente citotóxico por meio de um ligante lábil tal como um ligante peptídico (Val-Cit) que pode ser especificamente degradado pela captesina B. Em uma modalidade preferida, o agente citotóxico é SN38.

5 Aspectos adicionais da presente invenção incluem métodos para fazer os polímeros ativados contendo ligantes multifuncionais, métodos para preparar conjugados contendo os mesmos assim como métodos de tratamento baseados na administração de quantidades eficazes dos conjugados contendo uma porção biologicamente ativa ao paciente (mamífero) com necessidade do mesmo.

10 Uma das vantagens da presente invenção é a de que os sistemas de transporte poliméricos aqui descritos são estáveis e, assim, aumentam a biodisponibilidade de drogas.

Uma outra vantagem é a de que os sistemas de transporte polimérico podem liberar as drogas intactas dentro das células tumorais alvo.

15 Ainda outra vantagem é a de que a razão de liberação das drogas pode ser modificada para alcançar uma velocidade desejada.

Uma outra vantagem, ainda, dos sistemas poliméricos correspondendo à presente invenção é a de que eles são apropriados para drogas de baixo peso molecular e oligonucleotídeos tais como RNAs de pequena interferência antisenso (siRNA) ou compostos LNA.

20 Outras vantagens e vantagens adicionais ficarão evidentes a partir da descrição a seguir.

Para os fins da presente invenção, o termo "resíduo" deve ser entendido como significando uma parte do composto ao qual se faz referência, i.e. citotoxina, SN38, ligante permanente, ligante multifuncional, ligante lábil, etc. que permanece depois do composto ter sofrido reação de substituição com um outro composto.

25 Para os fins da presente invenção, o termo "resíduo polimérico" ou "resíduo PEG" deve ser entendido como significando a porção do polímero ou do PEG que permanece depois que este tenha sofrido uma reação com outros compostos, porções, etc.

30 Para os fins da presente invenção, alquilas substituídas incluem carboxialquilas, aminoalquilas, dialquilaminos, hidroxialquilas e mercaptoalquila; alquenilas substituídas incluem carboxialquenilas, aminoalquenilas, dialquenilaminos, hidroxialquenilas e

mercaptoalquênilas; alquênilas substituídas incluem carboxialquênilas, aminoalquênilas, dialquilaminos, hidroxialquênilas e mercaptoalquênilas; cicloalquênilas substituídas incluem porções tais como 4-clorociclohexila; arilas incluem porções tais como naftila; arilas substituídas incluem porções tais como 3-bromo fenila; aralquênilas incluem porções tais como tolila; heteroalquênilas incluem porções tais como etiltiofeno; heteroalquênilas substituídas incluem porções tais como 3-metoxitiofeno; alcoxi inclui porções tais como metoxi; e fenoxi inclui porções tais como 3-nitrofenoxi. Halo deve ser entendido como incluindo flúor, cloro, iodo e bromo.

Para os fins da presente invenção “ácido nucléico” ou “nucleotídeo” deve ser entendido como incluindo ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) tanto de fita simples quanto de fita dupla, a não ser que especificado em contrario, e modificações químicas dos mesmos.

Para os fins da presente invenção, os termos, “uma porção biologicamente ativa” e “um resíduo de porção biologicamente ativa” devem ser entendidos como significando a parte do composto biologicamente ativo que permanece depois do composto ter sofrido uma reação de substituição na qual a porção transportadora foi ligada.

Para fins de facilitar a descrição, e não de maneira limitante, deve ser entendido que o termo “porções biologicamente ativas” seja intercambiável com “drogas”, “agentes citotóxicos”, “citotóxicas”.

Para fins de facilitar a descrição, e não de maneira limitante, deve ser entendido que o termo “moléculas pequenas” seja intercambiável com “compostos farmacêuticamente ativos”.

A não ser que definido em contrario, para os fins da presente invenção:

O termo “alquila” deve ser entendido como incluindo, por exemplo, halo-, alcoxi-, e nitro- C_{1-12} alquênilas lineares, ramificadas ou substituídas, C_{3-8} cicloalquênilas substituídas ou cicloalquênilas substituídas, etc.;

o termo “substituído/a” deve ser entendido como incluindo a adição ou troca de um ou mais átomos contidos dentro de um grupo funcional ou composto por um ou mais átomos diferentes;

o termo “alquênilas substituídas” inclui carboxialquênilas, aminoalquênilas, dialquilaminos, hidroxialquênilas e mercaptoalquênilas;

o termo “cicloalquilas substituídas” inclui porções tais como 4-clorociclohexila; arilas incluem porções tais como naftila; arilas substituídas incluem porções tais como 3-bromofenila; aralquilas incluem porções tais como toluila; heteroalquilas incluem porções tais como etiltiofeno;

5 o termo “heteroalquilas substituídas” inclui porções tais como 3-metoxitiofeno; alcoxi inclui porções tais como metoxi; e fenoxi inclui porções tais como 3-nitrofenoxi;

o termo “halo” deve ser entendido como incluindo flúor, cloro, iodo e bromo; e

os termos “quantidades suficientes” e “quantidades eficazes”, para os fins da presente invenção, devem ser entendidos como significando uma quantidade que vai alcançar um
10 efeito terapêutico sendo que tal efeito deve ser entendido pelos técnicos no assunto.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIG. 1 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 1-5.

FIG. 2 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 6-7.

15 FIG. 3 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 8-9.

FIG. 4 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 10-14.

FIG. 5 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 15-17.

FIG. 6 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 18-19.

FIG. 7 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 20-23.

20 FIG. 8 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 24-25.

FIG. 9 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 26-28.

FIG. 10 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 29-32.

FIG. 11 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 33-35.

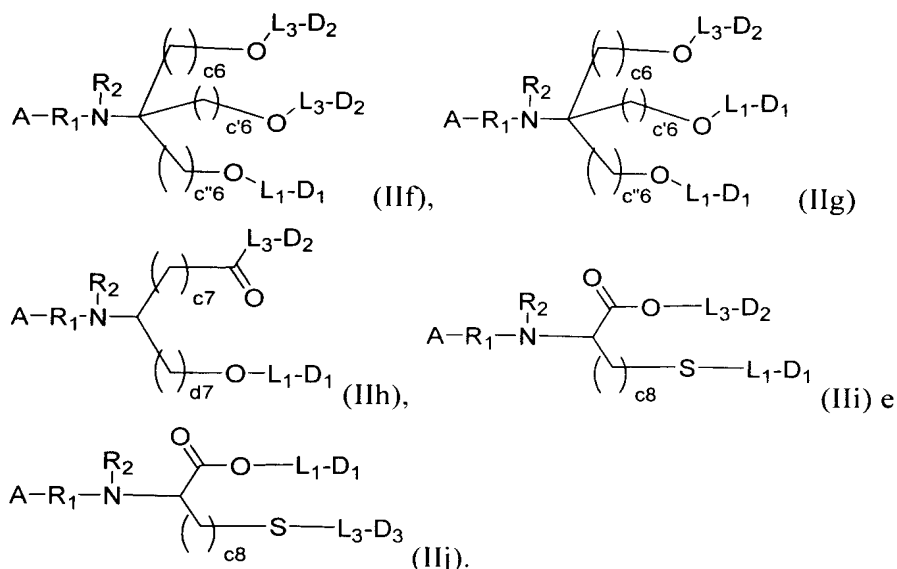
FIG. 12 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 36-38.

25 FIG. 13 esquematicamente ilustra métodos sintéticos descritos nos Exemplos 39-40.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A. PANORAMA

Em um aspecto da presente invenção, são providos compostos de (I):



em que

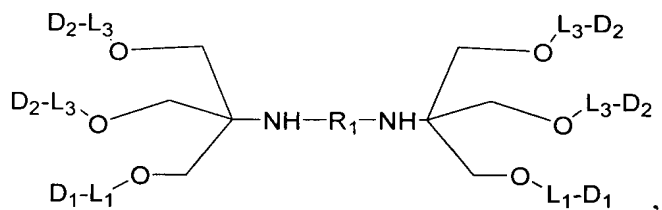
- 5 R_2 e R'_2 são independentemente selecionados dentre hidrogênio, C_{1-6} alquila, C_{2-6} alquenila, C_{2-6} alquinila, C_{3-19} alquila ramificada, C_{3-8} cicloalquila, C_{1-6} alquila substituída, C_{2-6} alquenila substituída, C_{2-6} alquinila substituída, C_{3-8} cicloalquila substituída, arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, C_{1-6} heteroalquila, C_{1-6} heteroalquila substituída, C_{1-6} alcoxi, ariloxi, C_{1-6} heteroalcoxi, heteroariloxi, C_{2-6} alcanoila, arilcarbonila, C_{2-6} alcoxicarbonila, ariloxicarbonila, C_{2-6} alcanoioli, arilcarboniloli, C_{2-6} alcanoiila substituída, arilcarbonila substituída, C_{2-6} alcanoioli substituída, ariloxicarbonila substituída, C_{2-6} alcanoioli substituída e arilcarboniloli substituída;

- 10 (c1), (c2), (c3), (c4), (c5), (c6), (c'6), (c7) e (c8) são independentemente zero ou um número inteiro positivo, preferencialmente zero ou um número inteiro de cerca de 1 a cerca de 10, e mais preferencialmente zero, 1 ou 2;

(d1), (d2), (d3), (d4), (d5) e (d7) são independentemente zero ou um número inteiro positivo, preferencialmente zero ou um número inteiro de cerca de 1 a cerca de 10, e mais preferencialmente zero ou um número inteiro de cerca de 1 a cerca de 4; e

todas as outras variáveis são previamente definidas.

- 20 Em outro aspecto, os sistemas poliméricos aqui descritos são tanto protegidos em um de seus terminais com um grupo CH_3 , i.e. mPEG tanto quanto, em outras modalidades, PEGs bis-ativados são providos, tais como os de Fórmula:





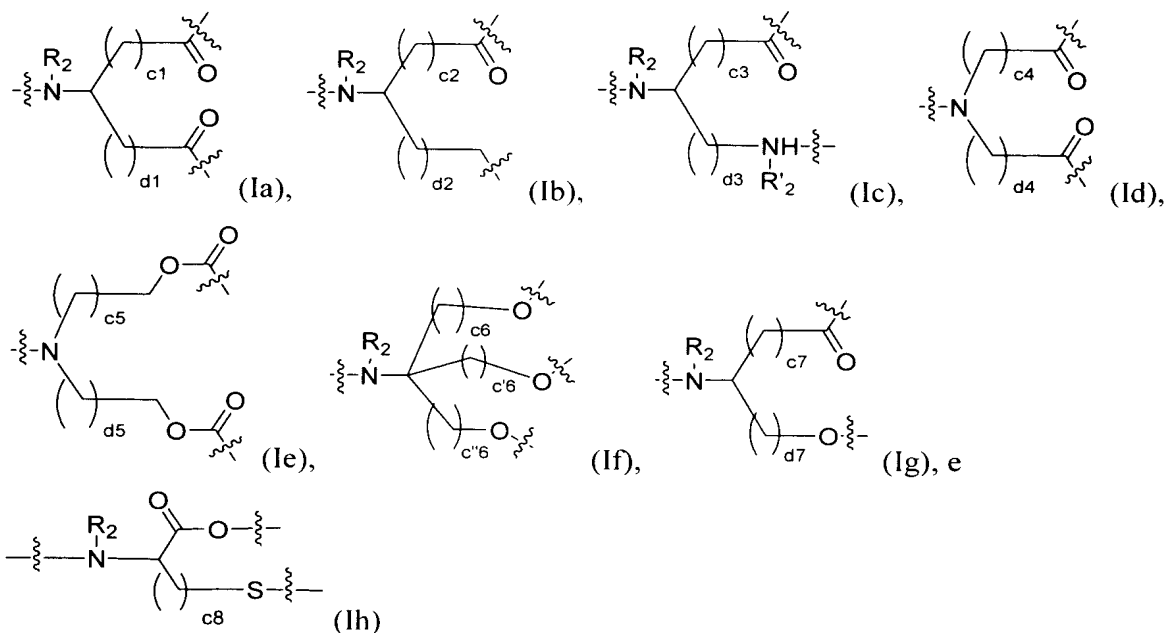
5

10

15

15

20

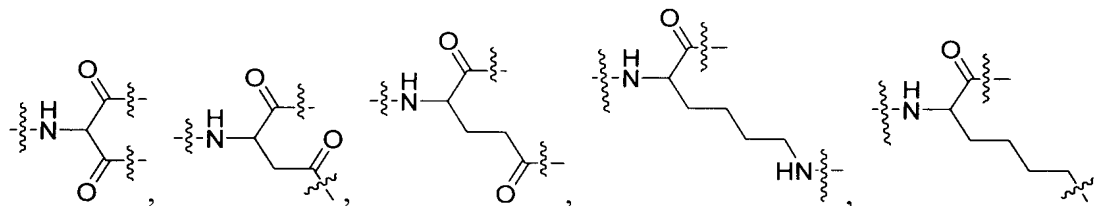


em que

- 5 R_2 e R'_2 são independentemente selecionados dentre hidrogênio, C_{1-6} alquila, C_{2-6} alquenila, C_{2-6} alquinila, C_{3-19} alquila ramificada, C_{3-8} cicloalquila, C_{1-6} alquila substituída, C_{2-6} alquenila substituída, C_{2-6} alquinila substituída, C_{3-8} cicloalquila substituída, arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, C_{1-6} heteroalquila, C_{1-6} heteroalquila substituída, C_{1-6} alcóxi, arilóxi, C_{1-6} heteroalcóxi, heteroarilóxi, C_{2-6} alcanoila, arilacarbonila, C_{2-6} alcoxicarbonila, ariloxicarbonila, C_{2-6} alcanoilóxi, arilcarbonilóxi, C_{2-6} alcanoila substituída, arilcarbonila substituída, C_{2-6} alcanoilóxi substituída, ariloxicarbonila substituída, C_{2-6} alcanoilóxi substituída e arilcarbonilóxi substituída;

(c1), (c2), (c3), (c4), (c5), (c6), (c'6), (c''6), (c7) e (c8) são previamente definidos; e
(d1), (d2), (d3), (d4), (d5) e (d7) são também previamente definidos.

- 15 Modalidades preferidas incluem:

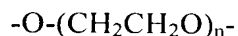


5

10

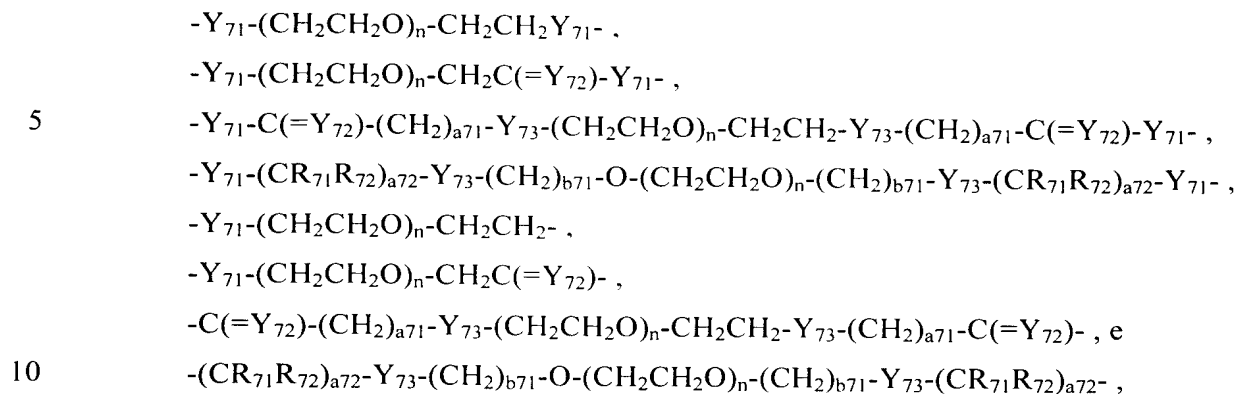
15

20



25

Alternativamente, a porção do resíduo polietileno glicol (PEG) da invenção pode ser representada pela estrutura:



em que:

Y_{71} e Y_{73} são independentemente O, S, SO, SO₂, NR₇₃ ou uma ligação;

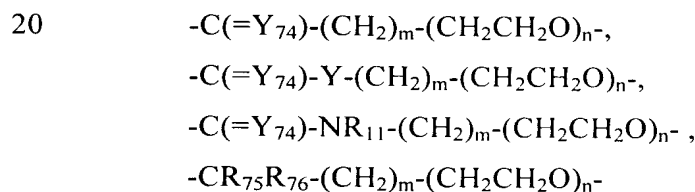
Y_{72} é O, S, ou NR₇₄;

R_{71-74} são independentemente as mesmas porções que podem ser utilizadas para R_2 ;

15 $(a71)$, $(a72)$, e $(b71)$ são independentemente zero ou um número inteiro positivo, preferencialmente 0-6, e mais preferencialmente 1; e

(n) é um número inteiro de cerca de 10 a cerca de 2300.

Como um exemplo, o PEG pode ser funcionalizado da seguinte maneira, não-limitante:



em que

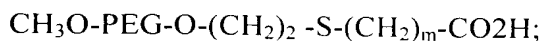
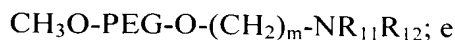
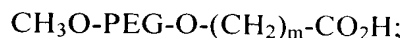
25 R_{75} e R_{76} são independentemente selecionados dentre of H, C₁₋₆ alquilas, arilas, arilas substituídas, aralquilas, heteroalquilas, heteroalquilas substituídas e C₁₋₆ alquilas substituídas;

m é zero ou é um número inteiro positivo, e preferencialmente 1;

Y_{74} é O ou S; e

n representa o grau de polimerização.

Muito embora as pro drogas da presente invenção possam ser formadas utilizando-se qualquer dos polímeros substancialmente não-antigênicos aqui descritos, alguns óxidos de polialquileno preferidos incluem:



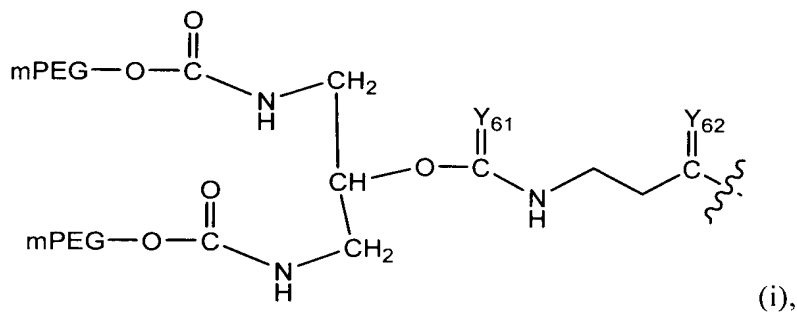
Quaisquer dos PEGs ativados conhecidos no estado da técnica.

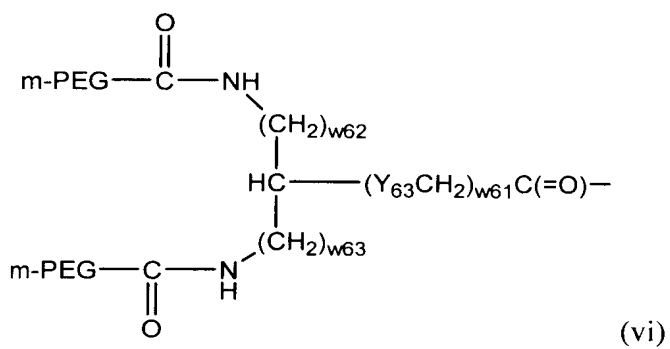
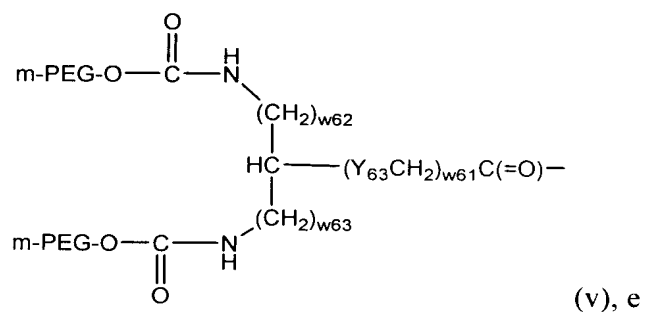
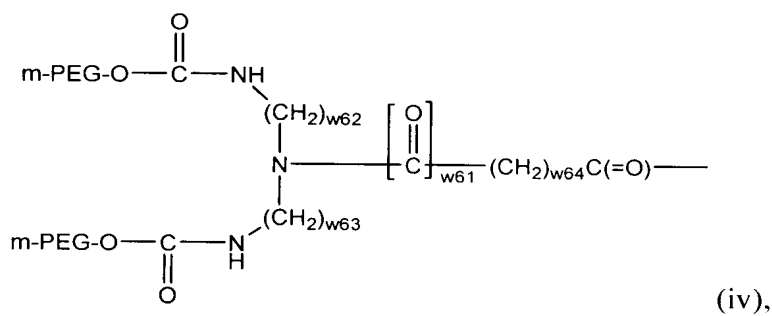
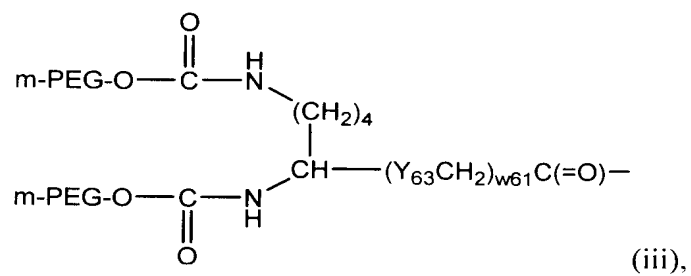
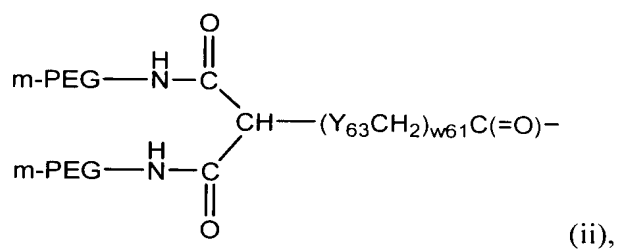
Em particular, polietileno glicóis mono-ativados (PEGs), PAOs terminados em C_{1-4} alquila tais mono-metil-polietileno glicóis (mPEGs) são preferidos quando polímeros mono-substituídos são desejados; óxidos de polietileno bis-ativados são preferidos quando pro drogas dissubstituídas são desejadas.

Polímeros ativados mono- ou di-ácido tais como ácidos PEG ou diácidos PEG são utilizados para proporcionar a ligação desejada. Ácidos PAO apropriados podem ser sintetizados pela conversão de mPEG-OH a um éster etílico. Ver também Gehrhardt, H., e colaboradores, Polymer Bulletin 18: 487 (1987) e Veronese, F.M., e colaboradores, J. Controlled Release 10; 145 (1989). Alternativamente, o ácido PAO pode ser sintetizado pela conversão de um mPEG-OH a um éster *t*-butílico. Ver, por exemplo, as patentes US Nos. 5.605.976 e US No. 5.965.566. Os ensinamentos destes documentos são aqui incorporados por referência.

Derivados ramificados ou U-PEG são descritos nas patentes US Nos. 5.643.575, 5.919.455, 6.113.906 e 6.566.506, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência.

Uma lista não-limitante destes polímeros corresponde aos sistemas poliméricos (i) - (vii) com as seguintes estruturas:





em que:

Y_{61-62} são independentemente O, S ou NR_{61} ;

Y_{63} é O, NR_{62} , S, SO ou SO_2

(w62), (w63) e (w64) são independentemente 0 ou um número inteiro positivo, preferencialmente de cerca de 0 a cerca de 10, mais preferencialmente de cerca de 1 a cerca de 6;

(w61) é 0 ou 1;

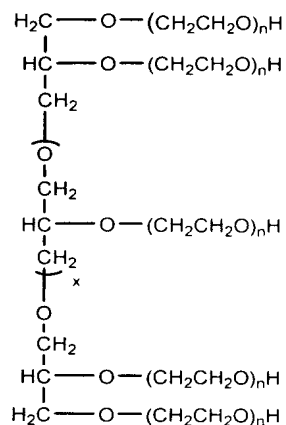
mPEG é metóxi PEG

em que PEG é previamente definido e o peso molecular total da porção polimérica é de cerca de 2.000 a cerca de 100000 daltons; e

R_{61} e R_{62} são independentemente selecionados dentre hidrogênio, C_{1-6} alquila, C_{2-6} alquenila, C_{2-6} alquinila, C_{3-19} alquila ramificada, C_{3-8} cicloalquila, C_{1-6} alquila substituída, C_{2-6} alquenila substituída, C_{2-6} alquinila substituída, C_3 cicloalquila substituída, arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, C_{1-6} heteroalquila, C_{1-6} heteroalquila substituída, C_{1-6} alcóxi, arilóxi, C_{1-6} heteroalcóxi, heteroarilóxi, C_{2-6} alcanoila, arilcarbonila, C_{2-6} alcóxicarbonila, ariloxicarbonila, C_{2-6} alcanoióxio, arilcarbonilóxi, C_{2-6} alcanoila substituída, arilcarbonila substituída, C_{2-6} alcanoióxio substituída, ariloxicarbonila substituída, C_{2-6} alcanoióxio substituída, e arilcarbonilóxi substituída.

Em ainda outro aspecto, os polímeros incluem PEG-OH multi-braços ou “PEG-estrela”, produtos tais como os descritos no catálogo “NOF Corp. Drug Delivery System catalog, Ver. 8, April 2006”, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência. Os conjugados poliméricos multi-braços apresentam quatro ou mais braços poliméricos e preferencialmente quatro ou oito braços poliméricos.

Para fins de ilustração e não limitantes, o resíduo de polietileno glicol (PEG) multi-braços pode ser

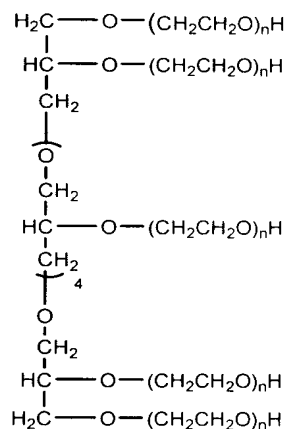


em que:

(x) é 0 e um número inteiro positivo, i.e. de cerca de 0 a cerca de 28; e

(n) é o grau de polimerização.

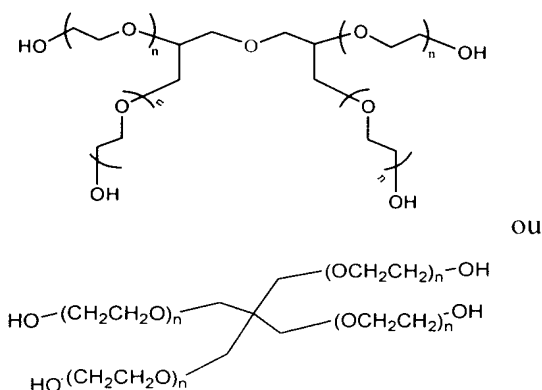
- 5 Em uma modalidade particular da presente invenção, o PEG multi-braços possui a estrutura:



em que n é um número inteiro positivo. Em uma modalidade preferida da invenção, os polímeros possuem um peso molecular total de cerca de 5.000 Da a cerca de 60.000 Da, e preferencialmente de 12.000 Da a 40.000 Da.

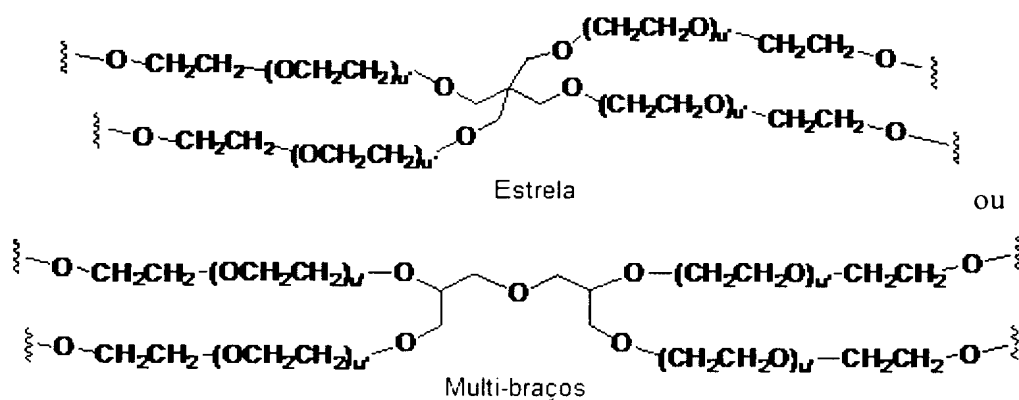
10

Em ainda outra modalidade particular, o PEG multi-braços possui a estrutura:



em que n é um número inteiro positivo. Em uma modalidade preferida da invenção, o grau de polimerização para o polímero multi-braços (n) é de cerca de 28 a cerca de 350 para fornecer polímeros tendo um peso molecular total de cerca de 5.000 Da a cerca de 60.000 Da, e preferencialmente de cerca de 65 a cerca de 270 (12.000-45.000 daltons) para fornecer polímeros tendo peso molecular total de cerca de 12.000 Da a 45.000 Da. Isto representa o número de unidades repetidoras na cadeia polimérica e é dependente do peso molecular do mesmo.

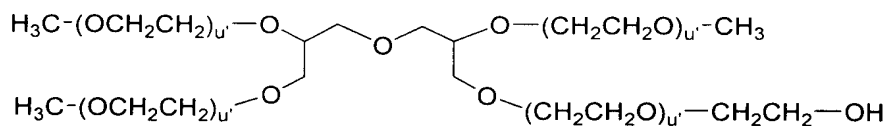
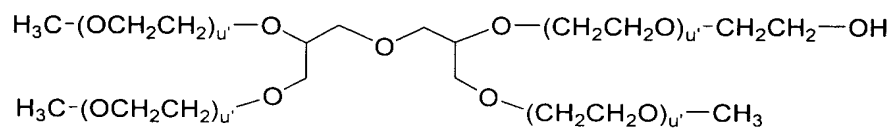
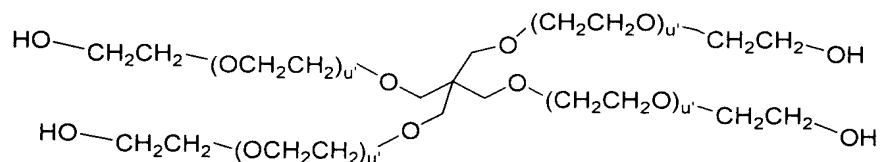
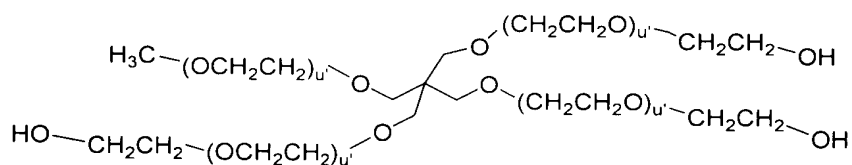
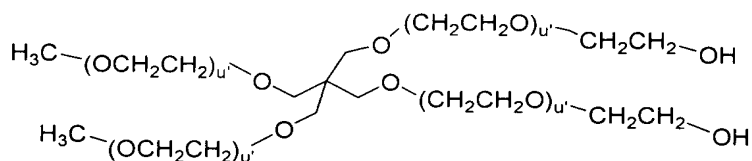
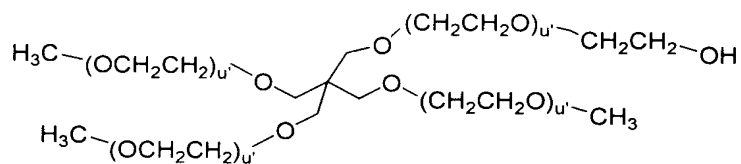
- 10 Os polímeros podem ser convertidos a polímeros apropriadamente ativados, utilizando-se técnicas de ativação descritas nas patentes US Nos. 5.122.614 ou 5.808.096. Especificamente, tais PEGs podem ser de Fórmula:

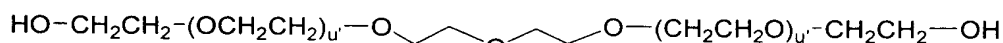
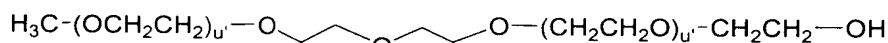
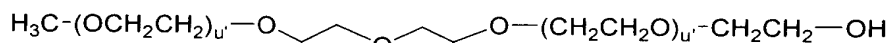
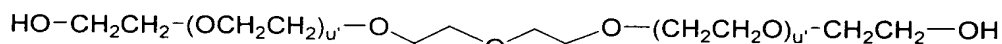
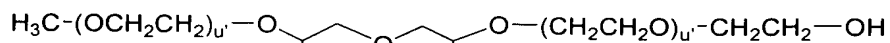


- 15 em que:

(u') é um número inteiro de cerca de 4 a cerca de 455; e até 3 porções terminais do resíduo é/são protegidas com metila ou outra alquila inferior.

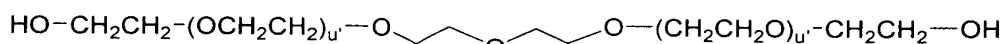
Em algumas modalidades preferidas, todos os quatro braços do PEG podem ser convertidos em grupos de ativação apropriados, para facilitar a ligação de grupos aromáticos. Tais compostos, antes da conversão, incluem:





5

e



As substâncias poliméricas aqui incluídas são preferencialmente hidrossolúveis em temperatura ambiente. Uma lista não-limitante de tais polímeros inclui homopolímeros de 10 óxido de polialquilenos, tais como polietileno glicol (PEG) ou polipropileno glicóis, polímeros polioxietilenados, copolímeros dos mesmos e copolímeros bloco dos mesmos, contanto que a solubilidade em água dos copolímeros bloco seja mantida.

Em ainda outra modalidade, e como uma alternativa aos polímeros de base PAO, um ou mais materiais não-antigênicos eficazes tais como dextrana, alcoóis polivinílicos, polímeros baseados em carboidrato, hidroxipropilmetacrilamida (HPMA), óxidos de polialquileno, e/ou copolímeros dos mesmos podem ser utilizados. Ver também a patente US No. 6.153.655, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência. Será entendido por um técnico no assunto que o mesmo tipo de ativação pode ser empregada, como descrito aqui para PAOs tais como PEG. Os técnicos no assunto irão ainda notar que a lista a seguir é meramente ilustrativa e que quaisquer materiais poliméricos tendo as qualidades aqui descritas são contemplados. Para os fins da presente invenção “substancialmente ou efetivamente não-antigênico” significa qualquer material conhecido no estado da técnica como sendo não-tóxico e não desencadeando uma resposta imunogênica apreciável em mamíferos.

Em alguns aspectos, polímeros tendo grupos amina terminais podem ser empregados para fazer os compostos aqui descritos. Os métodos para preparar polímeros contendo terminações amino em alta pureza são descritos nos pedidos de patente US Nos. 11/508.507 e 11/537.172, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência. Por exemplo, polímeros contendo azidas reagem com agentes redutores baseados em fosfina, tais como trifenilfosfina ou um agente redutor boroidreto de metal alcalino tal como NaBH_4 . Alternativamente, polímeros incluindo grupos de saída reagem com sais de amina tais como o sal de potássio de metil-tert-butil imidodicarbonato (KNMeBoc) ou o sal de potássio de di-tert-butil imidodicarbonato (KNBoc_2) seguido de desproteção do grupo amino protegido. A pureza dos polímeros contendo aminas terminais formados por estes processos é maior do que cerca de 95% e preferencialmente maior do que 99%.

Em aspectos alternativos, polímeros contendo grupos de ácidos carboxílicos terminais podem ser empregados nos sistema de transporte poliméricos aqui descritos. Métodos para preparar os polímeros tendo US No. 11/328.662, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência. Os métodos incluem primeiro se preparar um éster de alquila terciário de um óxido de polialquileno seguido da conversão ao derivado de ácido carboxílico do mesmo. A primeira etapa da preparação dos ácidos carboxílicos de PAO do processo inclui formar um intermediário tal como o éster t-butílico do ácido carboxílico óxido de polialquileno. Este intermediário é formado reagindo-se o PAO com um haloacetato de t-butila na presença de

uma base tal como t-butóxido de potássio. Uma vez formado o intermediário éster de t-butila, o derivado de ácido carboxílico do óxido de polialquilenos pode ser prontamente obtido em pureza que excede 92%, preferencialmente excedendo 97%, mais preferencialmente excedendo 99% e ainda mais preferencialmente excedendo 99,5% de pureza.

5

D. AGENTES DIRECIONADORES (D₁)

Agentes direcionadores podem ser ligados aos compostos poliméricos aqui descritos para guiar os conjugados até a área alvo *in vivo*. Os agentes direcionadores permitem que porções biologicamente ativas tais como compostos farmacologicamente ativos e oligonucleotídeos tenham eficácia terapêutica na área alvo, i.e. o local do tumor. O transporte direcionado *in vivo* aumenta o uptake celular destas moléculas para que tenham eficácia terapêutica melhorada. Em certos aspectos, alguns peptídeos penetradores de célula podem ser trocados por uma variedade de peptídeos direcionadores para transporte direcionado ao local do tumor.

10

15

20

25

Em um aspecto da invenção, a porção direcionadora, tal como um anticorpo de cadeia simples (SCA) ou anticorpo ligante de antígeno de cadeia simples, anticorpo monoclonal, peptídeos de adesão celular tais como peptídeos RGD e Selectina, peptídeos de penetração celular (CPPs) tais como TAT, Penetratina e (Arg)₉, ligas receptoras, moléculas de carboidrato direcionadoras ou lectinas, oligonucleotídeos, derivados de oligonucleotídeo tais como ácidos nucleicos bloqueados (LNA) e aptâmeros, ou semelhantes, permitem que drogas citotóxicas sejam especificamente direcionadas às regiões alvo. Ver *Curr Opin Pharmacol.* 2006 Oct;6(5):509-14, "Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery"; ver também *J Pharm Sci.* 2006 Sep;95(9):1856-72 "Cell adhesion molecules for targeted drug delivery", cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência.

30

As porções direcionadoras podem ser rotuladas com compostos biotinilados, compostos fluorescentes, compostos radiomarcados. Uma marca apropriada é preparada pela ligação de qualquer porção apropriada, *e.g.*, um resíduo de aminoácido, a qualquer isótopo com emissão conhecido no estado da técnica, marcador radio-opaco, marcador de ressonância magnética, ou outros marcadores isotópicos não-radioativos apropriados para imagem por ressonância magnética, marcadores do tipo fluorescente, marcadores exibindo

cores do visível e/ou capazes de fluorescer sob ultravioleta, infravermelho ou estimulação eletroquímica, para permitir a imagem do tecido tumoral durante procedimento cirúrgico e assim por diante. Opcionalmente, o marcador diagnóstico é incorporado a e/ou ligado a uma porção terapêutica conjugada, permitindo o monitoramento da distribuição terapêutica de um material biologicamente dentro de um paciente animal ou humano.

Em ainda uma modalidade adicional da presente invenção, os conjugados marcados são prontamente preparados por métodos conhecidos no estado da técnica com qualquer marcador apropriado, incluindo, e.g., marcadores radioisotópicos. Simplesmente para fins de exemplo, estes incluem ^{131}I odo, ^{125}I odo, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ecnecio e/ou ^{111}In dio para produzir agentes radioimunocintográficos para uptake seletivo em células tumorais *in vivo*. Por exemplo, existem vários métodos conhecidos no estado da técnica para ligar peptídeos a Tc-99m, incluindo, simplesmente para fins de exemplo, os mostrados nas patentes US Nos. 5.328.679; 5.888.474; 5.997.844 e 5.997.845, aqui incorporados por referência.

Porções direcionadoras preferidas são anticorpos de cadeia simples (SCAs) ou fragmentos variáveis de anticorpos de cadeia simples (sFv). Um SCA apresenta domínios de anticorpos que podem se ligar ou reconhecer moléculas específicas de células tumorais alvo. Adicionalmente ao fato de manter um sítio de ligação de antígeno, um SCA PEGilado pode, por meio de ligantes, reduzir a antigenicidade e aumentar a meia vida do SCA na corrente sanguínea.

Os termos “anticorpo de cadeia simples” (SCA), “molécula ou anticorpo que liga antígeno de cadeia simples” ou “Fv de cadeia simples” (sFv) são utilizados de maneira intercambiável. O anticorpo de cadeia simples tem afinidade de ligação com o antígeno. Anticorpo de cadeia simples (SCA) ou sFv de cadeia simples foram construídos de várias maneiras. Uma descrição da teoria e produção de proteínas ligantes de antígeno de cadeia simples pode ser encontrada nos pedidos de patente e patente US No. 10/915.069 e US No. 6.824.782, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência.

Tipicamente, domínios SCA ou Fv podem ser selecionados dentre anticorpos monoclonais conhecidos na literatura por suas abreviaturas 26-10, MOPC 315, 741F8, 520C9, McPC 603, D1.3, pHox murino, pHox humano, RFL3.8 sTCR, 1A6, Se155-4, 18-2-3, 4-4-20, 7A4-1, B6.2, CC49, 3C2, 2c, MA-15C5/K₁₂G₀, Ox, etc. (ver, Huston, J. S. e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); Huston, J. S. e

- colaboradores, SIM News 38(4) (Supp.):11 (1988); McCartney, J. e colaboradores, ICSU Short Reports 10:114 (1990); McCartney, J. E. e colaboradores, resultados não publicados (1990); Nedelman, M. A. e colaboradores, J. Nuclear Med. 32 (Supp.):1005 (1991); Huston, J. S. e colaboradores, In: Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B, editado por J. J. Langone, Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Huston, J. S. e colaboradores, In: Advances in the Applications of Monoclonal Antibodies in Clinical Oncology, Epenetos, A. A. (Ed.), London, Chapman & Hall (1993); Bird, R. E. e colaboradores, Science 242:423-426 (1988); Bedzyk, W. D. e colaboradores, J. Biol. Chem. 265:18615-18620 (1990); Colcher, D. e colaboradores, J. Nat. Cancer Inst. 82:1191-1197 (1990); Gibbs, R. A. e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4001-4004 (1991); Milenic, D. E. e colaboradores, Cancer Research 51:6363-6371 (1991); Pantoliano, M. W. e colaboradores, Biochemistry 30:10117-10125 (1991); Chaudhary, V. K. e colaboradores, Nature 339:394-397 (1989); Chaudhary, V. K. e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066-1070 (1990); Batra, J. K. e colaboradores, Biochem. Biophys. Res. Comm. 171:1-6 (1990); Batra, J. K. e colaboradores, J. Biol. Chem. 265:15198-15202 (1990); Chaudhary, V. K. e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9491-9494 (1990); Batra, J. K. e colaboradores, Mol. Cell. Biol. 11:2200-2205 (1991); Brinkmann, U. e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8616-8620 (1991); Seetharam, S. e colaboradores, J. Biol. Chem. 266:17376-17381 (1991); Brinkmann, U. e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3075-3079 (1992); Glockshuber, R. et al., Biochemistry 29:1362-1367 (1990); Skerra, A. e colaboradores, Bio/Technol. 9:273-278 (1991); Pack, P. e colaboradores, Biochemistry 31:1579-1534 (1992); Clackson, T. e colaboradores, Nature 352:624-628 (1991); Marks, J. D. e colaboradores, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Iverson, B. L. e colaboradores, Science 249:659-662 (1990); Roberts, V. A. e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6654-6658 (1990); Condra, J. H. e colaboradores, J. Biol. Chem. 265:2292-2295 (1990); Laroche, Y. e colaboradores, J. Biol. Chem. 266:16343-16349 (1991); Holvoet, P. e colaboradores, J. Biol. Chem. 266:19717-19724 (1991); Anand, N. N. e colaboradores, J. Biol. Chem. 266:21874-21879 (1991); Fuchs, P. e colaboradores, Biol Technol. 9:1369-1372 (1991); Breitling, F. e colaboradores, Gene 104:104-153 (1991); Seehaus, T. e colaboradores, Gene 114:235-237 (1992); Takkinen, K. e colaboradores, Protein Engng. 4:837-841 (1991); Dreher, M. L. e colaboradores, J. Immunol. Methods 139:197-205 (1991); Mottez, E. e

colaboradores, Eur. J. Immunol. 21:467-471 (1991); Traunecker, A. e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8646-8650 (1991); Traunecker, A. e colaboradores, EMBO J. 10:3655-3659 (1991); Hoo, W. F. S. e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4759-4763 (1993)). Cada uma destas publicações foi incorporada por referência.

5 Alternativamente, as porções direcionadoras podem ser oligonucleotídeos ou derivados destes. Os oligonucleotídeos (análogos) não são limitados a uma única espécie mas, ao contrário, são planejados para funcionar com uma variedade de tais porções, sendo entendido que ligantes podem se ligar a um ou mais grupos 3'- ou 5'-, normalmente grupos PO₄ ou SO₄ de um nucleotídeo. Os oligonucleotídeos incluem oligonucleotídeos antisenso ou
10 complementares, RNA de pequena interferência (siRNA), ácido nucléico bloqueado (LNA), micro RNA (miRNA), ácido nucléico peptídico (PNA), oligo morfolino fosforodiamidato (PMO) e aptamero, etc.

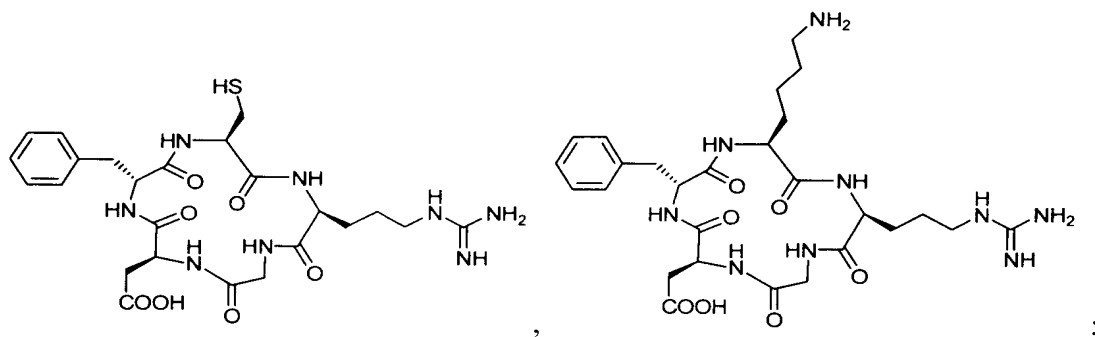
Por exemplo, uma lista não limitante de grupos direcionadores inclui fator de crescimento de célula vascular endotelial, FGF2, somatostatina e análogos de somatostatina,
15 transferrina, melanotropina, ApoE e peptídeos ApoE, fator de von Willebrand e peptídeos de fator de Willebrand, proteína de fibra adenoviral e peptídeos de proteína de fibra adenoviral, PD1 e peptídeos PD1, EGF e peptídeos EGF, peptídeos RGD, folato, etc. Outros agentes direcionadores opcionais notados pelo técnico no assunto podem também ser empregados nos compostos aqui descritos.

20 Preferencialmente, os agentes direcionadores incluem anticorpo de cadeia simples (SCA), peptídeos RGD, selectina, TAT, penetratina, Oligo(Arg), preferencialmente (Arg)₉, ácido fólico, etc. Para os fins da presente invenção, o termo "TAT" pode ser entendido como significando uma porção de trans-ativador da proteína de ativação de transcrição incluindo a sequência peptídica YGRKKRRQRRR, por exemplo. A lista das seqüências e estruturas de
25 peptídeos utilizados no relatório descritivo e exemplos inclui:

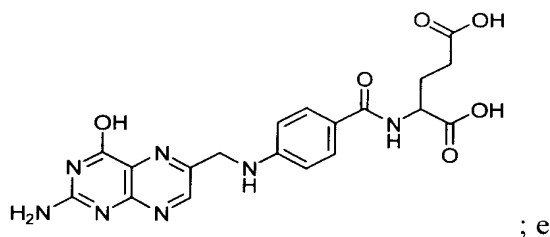
C-TAT: (SEQ ID NO: 1) CYGRKKRRQRRR ;

C-(Arg)₉: (SEQ ID NO: 2) CRRRRRRRRR ;

RGD pode ser linear ou cíclico:



ácido fólico



; e

- 5 (Arg)₉ pode incluir uma cisteína para conjugação tal como CRRRRRRRRR e TAT pode adicionar uma cisteína extra no final do peptídeo tal como CYGRKKRRQRRRC.

E. PORÇÕES BIOLOGICAMENTE ATIVAS (D₂)

10 Uma grande variedade de porções biologicamente ativas pode ser ligada aos polímeros ativados aqui descritos. As porções biologicamente ativas incluem compostos farmacologicamente ativos, enzimas, proteínas, oligonucleotídeos, anticorpos, anticorpos monoclonais, anticorpos de cadeia simples e peptídeos.

15 Qualquer agente citotóxico ou quimioterápico, i.e. ácido fólico, etc. Capaz de se ligar a um polímero, incluindo mas sem limitação aos das porções biologicamente ativas são descritos na patente US No. 5.965.566, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência.

Em um aspecto da invenção, os compostos biologicamente ativos são apropriados para uso medicinal ou diagnóstico no tratamento de animais, e.g., mamíferos incluindo humanos, para condições nas quais tal tratamento é desejado.

20 Em outro aspecto, porções biologicamente ativas contendo amino-, hidroxil- ou tiol- se encontram dentro do escopo da presente invenção. A única limitação nos tipos de porções

biologicamente ativas apropriadas para inclusão é a de que ao menos um grupo amino-, hidroxil- ou tiol- esteja disponível para reagir e se ligar com uma porção carregadora e que não haja perda substancial na bioatividade na forma do conjugado aos sistemas de transporte poliméricos aqui descritos.

5 Alternativamente, compostos precursores apropriados para incorporação nos compostos conjugados poliméricos de transporte da presente invenção podem ser ativos depois da liberação hidrolítica do composto ligado, ou inativos depois da liberação hidrolítica do composto ligado mas ativos depois de processamento/reação posterior. Por exemplo, uma droga anticancer que é transportado para a corrente sanguínea pelo sistema de transporte
10 polimérico permanecera inativa até entrar na célula cancerosa ou tumoral, onde será ativada pela química da célula, e.g., por uma reação enzimática que é única daquela célula.

Numa modalidade preferida os sistemas de transporte polimérico aqui descritos incluem compostos farmacologicamente ativos.

Para os fins da presente invenção deve ser entendido que os compostos
15 farmacologicamente incluem moléculas de baixo peso molecular. Tipicamente, os compostos farmacologicamente aceitáveis possuem um peso molecular menor do que cerca de 1.500 daltons. Uma lista não-limitante destes compostos inclui inibidores da DNA topoisomerase I tais como camptotecina e análogos, taxanos e derivados de paclitaxel, nucleosídeos incluindo AZT e aciclovir, compostos de antraciclina incluindo daunorrubicina e doxorrubicina,
20 compostos relacionados a anti-metabolitos incluindo Ara-C (citossina arabinosida) e gencitabina, etc.

1. Taxanos e Derivados de Taxano

Uma classe dos compostos incluídos nas composições de pro droga da presente
25 invenção é a dos taxanos. Para os fins da presente invenção, o termo “taxano” inclui todos os compostos dentro da família terpenica dos taxanos. Assim, taxol[®] (paclitaxel), derivados *tert*-butóxi-carbonil-amina 3'-substituídos (taxotere[®]) e semelhantes assim como outros análogos disponíveis de, por exemplo Sigma Chemical de St. Louis, Missouri, se encontram dentro do escopo da presente invenção.

30 Estes compostos se mostraram agentes anti-câncer eficazes. Vários estudos indicam que os agentes possuem atividade contra diversas neoplasias. Até agora, o uso deles era

severamente por, entre outros motivos, sua pequena disponibilização, pouca solubilidade em água e hipersensitividade. Deve ser entendido que outros taxanos, incluindo 7-aril-carbamatos e 7-carbazatos revelados nas patentes US Nos. 5.622.986 e 5.547.981 também podem ser incluídos dentre a pro drogas da presente invenção. Os ensinamentos destes documentos são aqui incorporados por referência.

Embora os exemplos descrevam *inter alia* paclitaxel para fins ilustrativos, deve ser entendido que os métodos aqui descritos são apropriados para todos os taxanos e moléculas relacionados.

2. Camptotecina e Inibidores Relacionados da Topoisomerase I

Camptotecina é um alcalóide citotóxico insolúvel em água produzido por árvores *camptoteca accuminata* naturais da China e *nothapodytes foetida* da Índia. Camptotecina, compostos relacionados e análogos são também conhecidos por serem potenciais anticancerígenos ou agentes antitumorais e se mostraram ativos *in vitro* e *in vivo*.

Camptotecina e compostos relacionados são também candidatos para conversão a pro drogas da presente invenção. Ver, por exemplo a patente US No. 5.004.758 e a publicação de Hawkins, "Oncology", de dezembro de 1992, pgs. 17-23. Camptotecina e análogos relacionados são, por exemplo, Topotecan, Irinotecan (CPT-11) ou SN38.

Análogos de camptotecina adicionais incluem aqueles reportados na literatura incluindo 10-hdroxicamptotecinas, 11-hidroxiamptotecinas e/ou 10,11-dihidroxiamptotecinas, 7- e/ou 9- alquila, alquila substituída, cicloalquila, alcóxi, alquenila, aminoalquila, etc. camptotecinas, camptotecinas substituídas no anel-A tais como 10,11-alquilenodioxiamptotecinas, tais como as descritas na patente US No. 5.646.159, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência, etc.

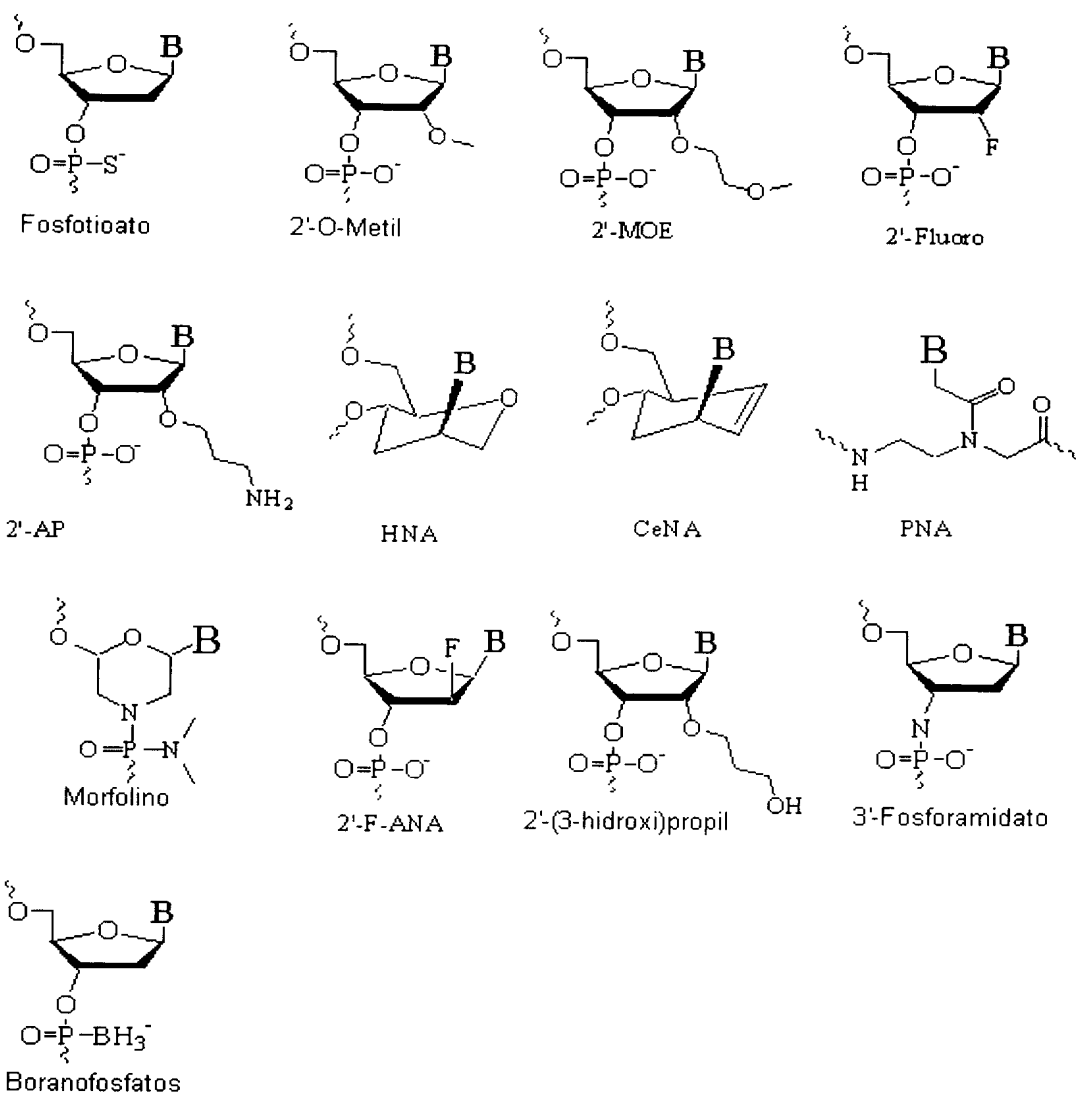
Em uma modalidade preferida da presente invenção o agente citotóxico é SN38.

3. Oligonucleotídeos

De modo a entender completamente o escopo da presente invenção, os seguintes termos são definidos. O técnico no assunto entenderá que os termos "ácido nucléico" ou "nucleotídeo" se aplicam ao ácido desoxirribonucleico ("DNA"), ácido ribonucleico ("RNA") tanto de fita simples quanto de fita dupla, a menos que especificado em contrario, e

quaisquer modificações químicas dos mesmos. Um “oligonucleotídeo” é geralmente um polinucleotídeo pequeno, *e.g.*, variando em tamanho de cerca de 2 a cerca de 200 nucleotídeos, ou mais preferencialmente de cerca de 10 a cerca de 30 nucleotídeos de comprimento. Os oligonucleotídeos de acordo com a presente invenção são geralmente
5 ácidos nucléicos sintéticos e são de fita simples, a não ser que especificado em contrário. Os termos “polinucleotídeo” e “ácido polinucleico” podem ser utilizados aqui como sinônimos.

Modificações nos oligonucleotídeos contemplados na invenção incluem, por exemplo, a adição ou a substituição de nucleotídeos selecionados com grupos funcionais ou porções que permitem a ligação covalente de um oligonucleotídeo a um polímero desejado,
10 e/ou a adição ou substituição de porções funcionais que incorporem carga adicional, polarizabilidade, ligação hidrogênio, interação eletrostática e funcionalidade ao oligonucleotídeo. Tais modificações incluem, mas não se limitam a, modificações na posição 2'- do açúcar, modificações na posição 5- de pirimidina, modificações na posição 8- de purina, modificações em aminas exocíclicas, substituição de 4-tiouridina, substituição de 5-
15 bromo ou 5-iodouracila, modificações no esqueleto, metilações, combinações de pares e bases tais como as das isobases isocitidina e isoguanidina, e combinações análogas. Modificações de oligonucleotídeo também podem incluir modificações 3' e 5' tais como proteção. Uma lista não-limitante de análogos de nucleosídeo inclui:



Ver mais exemplos de análogos de nucleosídeos descritos em Freier & Altmann; *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443 e Uhlmann; *Curr. Opinion in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência.

- 5 O termo “antisense”, como aqui utilizado, se refere a sequência e nucleotídeos que são complementares a sequência específicas de DNA ou RNA que codificam um produto gênico ou que codificam uma sequência controle. O termo “fita antisense” é utilizado em referência a uma fita de ácido nucléico que é complementar à fita “senso”. Na operação normal do metabolismo celular, a fita senso da molécula de DNA é a fita que codifica polipeptídeos e/ou outros produtos gênicos. A fita senso serve como um molde para a síntese
- 10

do RNA mensageiro (“mRNA”) transcrito (uma fita antisenso) que, por sua vez, direciona a síntese de qualquer produto gênico codificado. Moléculas de ácido nucléico antisenso podem ser produzidas por métodos conhecidos no estado da técnica, incluindo a síntese pela ligação do gene(s) de interesse em orientação reversa em um promotor viral que permite a síntese de uma fita complementar. Uma vez introduzida na célula, esta fita transcrita combina com seqüências naturais produzidas pela célula para formar duplexos. Estes duplexos então bloqueiam tanto transcrição quanto translação posteriores. Desta maneira, fenótipos mutantes podem ser gerados. As designações “negativo” ou (-) são também conhecidas no estado da técnica como se referindo à fita antisenso e “positivo” ou (+) são como se referindo a fitas senso.

Em uma modalidade preferida, a escolha de conjugação é um *n* oligonucleotídeo (ou “polinucleotídeo”) e, depois da conjugação, o alvo é referido como um resíduo de oligonucleotídeo. Os oligonucleotídeos podem ser selecionados dentre quaisquer oligonucleotídeos e oligodeoxinucleotídeos com esqueletos fosfodiéster ou fosforotioato conhecidos no estado da técnica.

Os derivados de oligonucleotídeos ou oligonucleotídeo podem incluir de cerca de 10 a cerca de 1000 ácidos nucléicos e, preferencialmente, polinucleotídeos relativamente pequenos, *e.g.*, variando em tamanho de cerca de 2 a cerca de 200 nucleotídeos, ou mais preferencialmente de cerca de 10 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento.

Adicionalmente, oligonucleotídeos e oligodeoxinucleotídeos úteis de acordo com a presente invenção incluem, mas não são limitados a, os seguintes:

Oligonucleotídeos e oligodeoxinucleotídeos com esqueletos naturais fosfodiéster ou fosfotioato ou qualquer análogo de esqueleto modificado;

LNA (Ácido nucléico bloqueado);

PNA (Ácido nucléico com esqueleto peptídico);

RNA de pequena interferência (siRNA);

microRNA (miRNA);

Ácido nucléico com esqueleto peptídico (PNA);

Oligonucleotídeos morfolino fosfodiamidato (PMO);

tríciclo-DNA;

decoi ODN (oligonucleotídeo de fita dupla);

seqüência de RNA catalítica (RNAi);
 ribozimas;
 aptameros;
 spiegelmeros (oligonucleotídeos de conformação L);

5 CpG oligômeros, e semelhantes, tais como os descritos em:

Tides 2002, "Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences", May 6-8, 2002, Las Vegas, NV e "Oligonucleotide & Peptide Technologies", 18th & 19th November 2003, Hamburg, Germany, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

10 Oligonucleotídeos de acordo com a presente invenção podem opcionalmente incluir quaisquer análogos ou derivados apropriados conhecidos no estado da técnica, incluindo os listados na Tabela 1 abaixo:

TABELA 1	
Análogos de Nucleotídeos e Derivados representativos	
4-acetilcitidina	5-metoxiaminometil-2-tiouridina
5-(carboxihidroximetil)uridina	beta, D-manosilqueuosina
2'-O-metilcitidina	5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina
5-carboximetilaminometil-2-tiouridina	5-metoxycarbonilmetiluridina
5-carboximetilaminometiluridina	5-metoxiuridina
Dihidrouridina	2-metiltio-N6-isopenteniladenosine
2'-O-metilpseudouridina	N-((9-beta-D-ribofuranosil-2-metiltiopurin-6-il)carbamoil)treonina
D-galactosilqueuosina	N-((9-beta-D-ribofuranosilpurin-6-il)N-metilcarbamoil)treonina
2'-O-metilguanosina	Ácido uridina-5-oxiacético -metilester
Inosina	Ácido uridina-5-oxiacético
N6-isopenteniladenosina	Wibutosina
1-metiladenosina	Pseudouridina
1-metilpseudouridina	Queuosina
1-metilguanosina	2-tiocitidina
1-metilinosina	5-metil-2-tiouridina
2,2-dimetilguanosina	2-tiouridina
2-metiladenosina	4-tiouridina
2-metilguanosina	5-metiluridina
3-metilcitidina	N-((9-beta-D-ribofuranosilpurina-6-il)-carbamoil)treonina
5-metilcitidina	2'-O-metil-5-metiluridina
N6-metiladenosina	2'-O-metiluridina
7-metilguanosina	wibutosina
5-metilaminometiluridina	3-(3-amino-3-carboxi-propil)uridina
Adenosina bloqueada	Citidina bloqueada

Guanosina bloqueada	Timina bloqueada
Uridina bloqueada	Metilcitidina bloqueada

Preferencialmente, o oligonucleotídeo se envolve nas células tumorais alvo ou regula a proteína implicada na resistência das células tumorais ao composto terapêutico anti-câncer. Por exemplo, qualquer proteína conhecida no estado da técnica, tal como BCL-2, para 5 regulação de oligonucleotídeos antisensos para terapia do câncer pode ser utilizada para a presente invenção. Ver o pedido de patente US No. 10/822.205, depositado em 9 de abril de 2004, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência. Uma lista não-limitante de oligonucleotídeos terapêuticos preferidos inclui oligonucleotídeos antisenso HIF-1 α e oligonucleotídeos. antisense Survivina.

10 Em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo pode ser, por exemplo, um oligonucleotídeo que tenha substancialmente uma sequência de nucleotídeos substancialmente similar a de Genasense (a/k/a oblimersen de sódio, produzido por Genta Inc., Berkeley Heights, NJ). Genasense é um oligonucleotídeo antisenso de fosfotioato de 18 unidades, TCTCCCAGCGTGCGCCAT (SEQ ID NO: 6), complementar aos seis primeiros 15 códons da sequência iniciadora do mRNA humano bcl-2 (mRNA humano bcl-2 é conhecido no estado da técnica, e é descrito, *e.g.*, como SEQ ID NO: 19 na patente US No. 6.414.134, aqui incorporada por referência). O U.S. Food and Drug Administration (FDA) deu ao Genasense a classificação de Droga Órfã (Orphan Drug) em agosto de 2000. Modalidades preferidas incluem:

20 (i) LNA antisenso Survivina (SEQ ID NO: 3)

$^mC_s-T_s-^mC_s-A_s-a_s-t_s-c_s-c_s-a_s-t_s-g_s-g_s-^mC_s-A_s-G_s-c$;

onde as letras maiúsculas representam LNA, o “s” representa um esqueleto fosfotioato;

(ii) siRNA antisenso Bcl2:

25 SENSE 5' - GCAUGCGGCCUCUGUUUGAdTdT-3' (SEQ ID NO: 4)

ANTISENSE 3' - dTdTCGUACGCCGGAGACAAACU-5' (SEQ ID NO: 5)

onde dT representa DNA;

(iii) Genasense (oligonucleotídeo fosfotioato antisenso): (SEQ ID NO: 6)

$t_s-c_s-t_s-c_s-c_s-c_s-a_s-g_s-c_s-g_s-t_s-g_s-c_s-g_s-c_s-c_s-c_s-a_s-t$

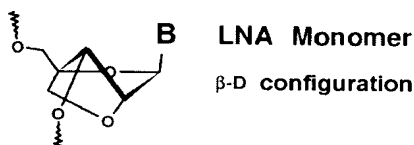
onde as letras minúsculas representam DNA e “s” representa esqueleto fosfotioato;

(iv) HIF1 α LNA antisenso (SEQ ID: 7)

5'-_sT_sG_sG_sc_sa_sg_sc_sa_st_sc_sc_sT_sG_sT_sa-3' (SEQ ID NO: 7)

5 onde as letras maiúsculas representam LNA, o “s” representa um esqueleto fosfotioato;

LNA inclui 2'-O, 4'-C metileno-biciclonucleotídeo como mostrado abaixo:



onde “monomer” = monômero e “configuration” = configuração.

10 Ver a descrição detalhada de LNA de survivina nos pedidos de patente US Nos. 11/272.124, intitulado “LNA Oligonucleotídeos and the Treatment of Cancer” e 10/776.934, intitulado “Oligomeric Compounds for the Modulation Survivin Expression”, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência. Ver também os pedidos de patente US
15 Nos. 10/407.807, intitulado “Oligomeric Compounds for the Modulation HIF-1 Alpha Expression” e 11/271.686, intitulado “Potent LNA Oligonucleotídeos for Inhibition of HIF-1A Expression”, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

Os oligonucleotídeos empregados nos compostos aqui descritos podem ser modificados com ligantes (CH₂)_w amino nas terminações 5' ou 3' dos oligonucleotídeos, onde w, nesse aspecto, é um número inteiro positivo preferencialmente de cerca de 1 a cerca
20 de 10, preferencialmente 6. Os oligonucleotídeos modificados contemplados nos compostos aqui descritos podem ser NH-(CH₂)_w-Oligonucleotídeo.

Numa modalidade preferida, a terminação 5' da mesma fita de siRNA é modificada. Por exemplo, o siRNA empregado nos conjugados poliméricos é modificado com um 5'-C₆-NH₂. Uma modalidade particular da presente invenção emprega Bcl2-siRNA tendo a
25 sequência de

SENSO 5'-(NH₂-C₆)GCAUGCGGCCUCUGUUUGAdTdT-3'

ANTISENSO 3'-dTdTCGUACGCCGGAGACAAACU-5'.

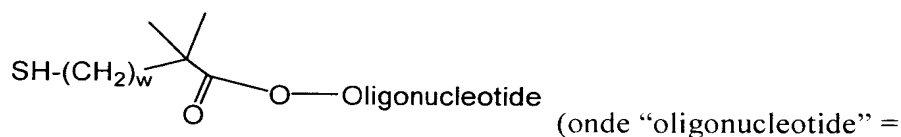
Em uma outra modalidade preferida, os compostos aqui descritos podem incluir oligonucleotídeos modificados com ésteres impedidos contendo ligantes $(\text{CH}_2)_w$ amino. Ver o pedido de patente US No. 60/844.942 intitulado "Polyalkylene Oxide Having Hindered Ester-Based Biodegradable Linkers", cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência. Os compostos poliméricos podem liberar os oligonucleotídeos sem a cauda amino. Por exemplo, os oligonucleotídeos podem ter a estrutura:



oligonucleotídeo)

em que w é um número inteiro positivo de cerca de 1 a cerca de 10, preferencialmente cerca de 6.

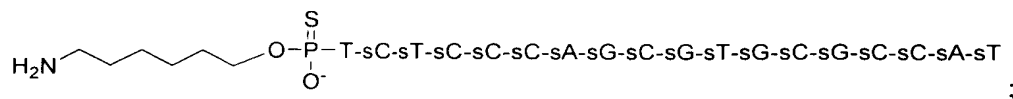
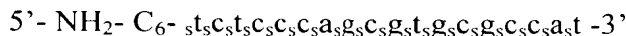
Em ainda outra modalidade preferida, os oligonucleotídeos podem ser modificados com ligantes $(\text{CH}_2)_w$ sulfidril (tio oligonucleotídeos). Os tio oligonucleotídeos podem ser utilizados para conjugação direta ao resíduo cisteína do peptídeo positivamente carregado por meio do grupo maleimidila. Os tio oligonucleotídeos podem ter estrutura $\text{SH}-(\text{CH}_2)_w$ -Oligonucleotídeo. Os tio oligonucleotídeos podem ainda incluir ésteres impedidos tendo a estrutura:



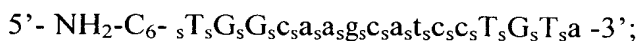
oligonucleotídeo).

Exemplos dos oligonucleotídeos modificados incluem:

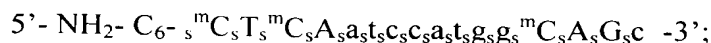
(i) Genasense modificado com cauda $\text{C}_6\text{-NH}_2$:



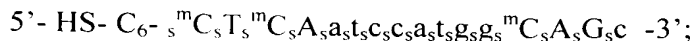
(ii) HIF1 α LNA antisenso modificado com cauda $\text{C}_6\text{-NH}_2$:



(iii) Survivina LNA antisenso modificado com cauda $\text{C}_6\text{-NH}_2$:

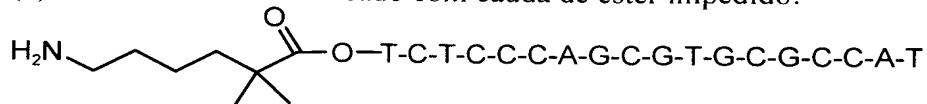


(iv) Survivina LNA antisenso modificado com cauda $\text{C}_6\text{-SH}$:



5

(v) Genasense modificado com cauda de éster impedido:



4. Porções Biologicamente Ativas Adicionais

10 Em adição, os compostos da presente invenção podem ser preparados utilizando-se muitos outros compostos. Por exemplo, os compostos biologicamente ativos tais como derivados cisplatina contendo grupos OH, floxuridina, podofilotoxina e compostos relacionados podem ser incluídos.

15 Outros compostos precursores úteis incluem, por exemplo, algumas proteínas, enzimas e peptídeos de baixo peso molecular biologicamente ativos, incluindo peptido glicos, assim como outros agentes anti-tumor, agentes cardiovasculares tais como forskolina, anti-neoplásicos tais como combretastatina, vinblastina, vincristina, doxorubicina, AraC, maitansina, etc. anti-infectivos tais como vancomicina, etc. anti-fungicos tais como nistatin ou amfoteracina B, agentes anti-inflamatórios, agentes esteroidais
20 e semelhantes.

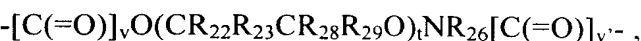
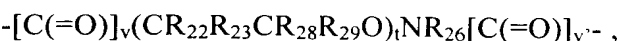
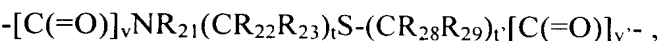
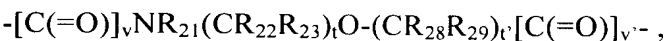
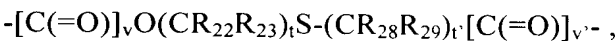
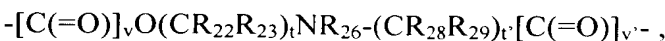
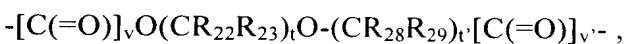
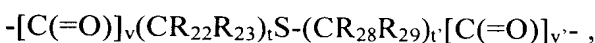
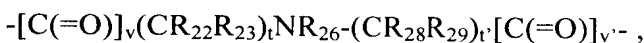
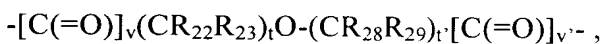
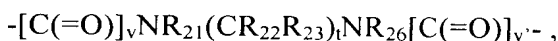
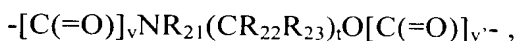
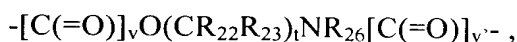
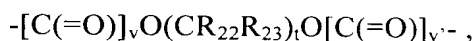
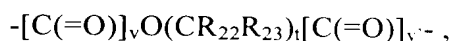
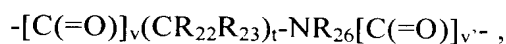
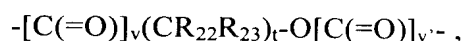
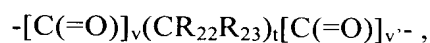
A seguir ilustram-se porções biologicamente ativas que são apropriadas para as pro drogas da presente invenção.

F. LIGANTES PERMANENTES E LÁBEIS: (L_1 e L_3)

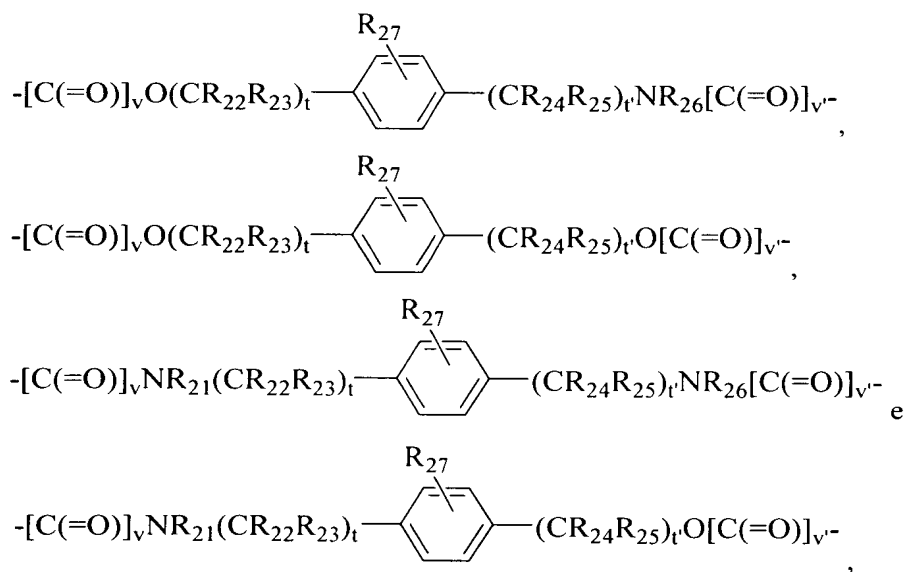
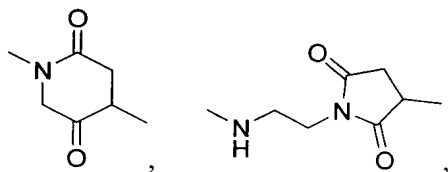
25 Os ligantes L_1 e L_3 incluem ligantes bifuncionais. Os bifuncionais podem ser ligantes permanentes ou lábeis. Os ligantes bifuncionais incluem aminoácidos ou derivados de aminoácidos. Os aminoácidos podem ser tanto aminoácidos de ocorrência natural ou não. Derivados e análogos de aminoácidos de ocorrência natural, assim como vários aminoácidos sem ocorrência natural conhecidos no estado da técnica (D ou L), hidrofóbicos ou não,
30 também são contemplados dentro do escopo da invenção. Uma lista não-limitante apropriada

dos aminoácidos sem ocorrência natural inclui ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiônico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico, ácido 6-aminocapróico, ácido 2-aminoheptanóico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimelico, ácido 2,4-aminobutírico, desmosina, ácido 2,2-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiônico, N-etilglicina, N-etilasparagina, 3-hidroxirolina, 4-hidroxirolina, isodesmosina, allo-isoleucina, N-metilglicina, sarcosina, N-metil-isoleucina, 6-N-metil-lisina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, e ornitina. Alguns resíduos de aminoácidos preferidos são selecionados dentre glicina, alanina, metionina e sarcosina e, mais preferencialmente, glicina.

Alternativamente, L_1 e L_3 podem ser selecionados dentre:



- $-[C(=O)]_v O(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t [C(=O)]_{v'}-$,
 $-[C(=O)]_v NR_{21}(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t NR_{26}[C(=O)]_{v'}-$,
 $-[C(=O)]_v NR_{21}(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t [C(=O)]_{v'}-$,
 $-[C(=O)]_v (CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t (CR_{24}R_{25})_{t'} [C(=O)]_{v'}-$,
5 $-[C(=O)]_v O(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t (CR_{24}R_{25})_{t'} [C(=O)]_{v'}-$,
 $-[C(=O)]_v NR_{21}(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t (CR_{24}R_{25})_{t'} [C(=O)]_{v'}-$,
 $-[C(=O)]_v (CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t (CR_{24}R_{25})_{t'} O[C(=O)]_{v'}-$,
 $-[C(=O)]_v (CR_{22}R_{23})_t (CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_{t'} [C(=O)]_{v'}-$,
 $-[C(=O)]_v (CR_{22}R_{23})_t (CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_{t'} NR_{26}[C(=O)]_{v'}-$,
10 $-[C(=O)]_v O(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t (CR_{24}R_{25})_{t'} O[C(=O)]_{v'}-$,
 $-[C(=O)]_v O(CR_{22}R_{23})_t (CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_{t'} [C(=O)]_{v'}-$,
 $-[C(=O)]_v O(CR_{22}R_{23})_t (CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_{t'} NR_{26}[C(=O)]_{v'}-$,
 $-[C(=O)]_v NR_{21}(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t (CR_{24}R_{25})_{t'} O[C(=O)]_{v'}-$,
 $-[C(=O)]_v NR_{21}(CR_{22}R_{23})_t (CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_{t'} [C(=O)]_{v'}-$,
15 $-[C(=O)]_v NR_{21}(CR_{22}R_{23})_t (CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_{t'} NR_{26}[C(=O)]_{v'}-$,



20

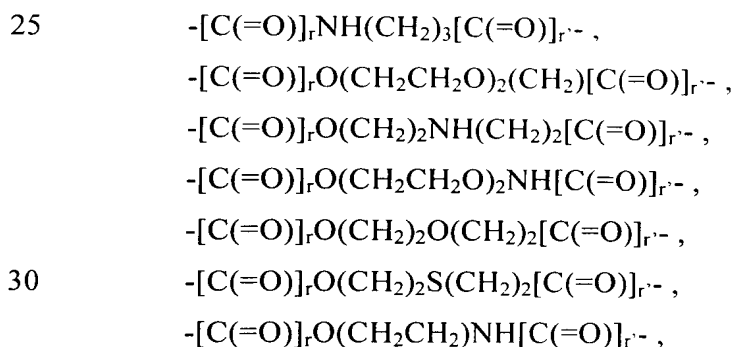
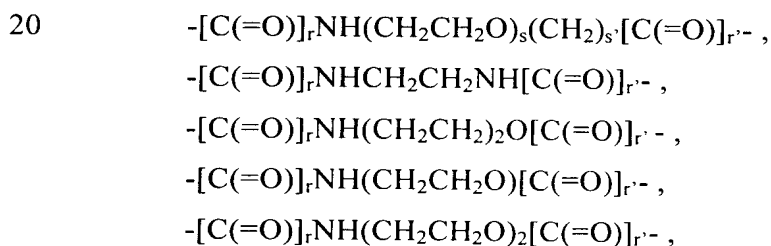
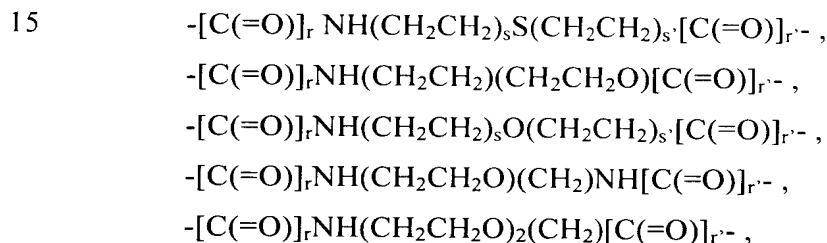
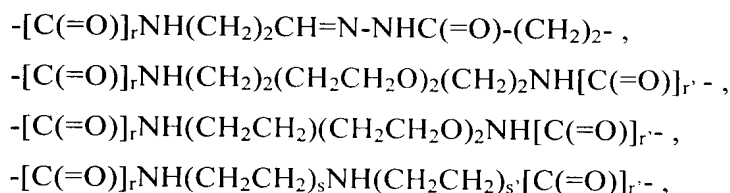
em que:

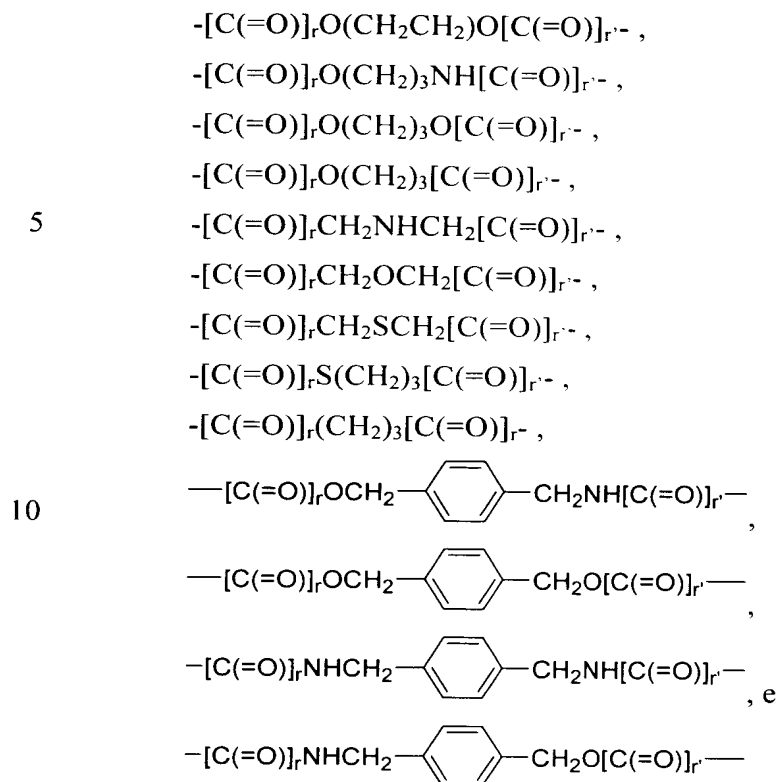
R_{21-29} são independentemente selecionados dentre hidrogênio, C_{1-6} alquilas, C_{3-12} alquilas ramificadas, C_{3-8} cicloalquilas, C_{1-6} alquilas substituídas, C_{3-8} cicloalquilas substituídas, arilas, arilas substituídas, aralquilas, C_{1-6} heteroalquilas, C_{1-6} heteroalquilas substituídas, C_{1-6} alcóxi, fenóxi e C_{1-6} heteroalcóxi;

5 (t) e (t') são independentemente zero ou um número inteiro positivo, preferencialmente zero ou r um número inteiro de cerca de 1 a cerca de 12, mais preferencialmente um número inteiro de cerca de 1 a cerca de 8 e ainda mais preferencialmente 1 ou 2; e

(v) e (v') são independentemente zero ou 1.

10 Preferencialmente, os ligantes bifuncionais podem ser selecionados dentre:





em que (r) e (r') são independentemente zero ou 1, contanto que ambos (r) e (r') não
 15 sejam simultaneamente zero.

1. Ligantes lábeis

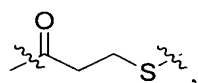
Numa modalidade preferida de presente invenção, os compostos aqui descritos
 apresentam uma porção biologicamente ativa ligada a um ligante lábil. Uma vantagem da
 20 invenção é que a porção biologicamente ativa pode ser liberada de maneira controlada.

Dentre os ligantes lábeis podem ser ligantes baseados na eliminação de benzila,
 ligantes baseados em triálquila bloqueadas (ou baseados em bloqueio lactonizado triálquila),
 ligantes baseados em bicina, ligantes ácidos lábeis, peptídeos lisossomalmente cliváveis e
 peptídeos cliváveis por captepsina B. Dentre os ligantes ácidos lábeis podem ser ligação de
 25 dissulfeto, ligantes contendo hidrazona e ligantes contendo tiopropionato.

Alternativamente, os ligantes lábeis são ligantes lábeis intracelulares, ligantes
 extracelulares e ligantes ácidos lábeis. Os ligantes ácidos lábeis, tais como ligações de
 hidrazona, podem ser hidrolizados no ambiente ácido do lisossoma. Alguns ligantes lábeis

1





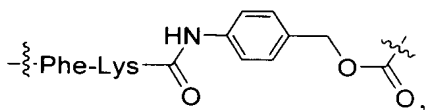
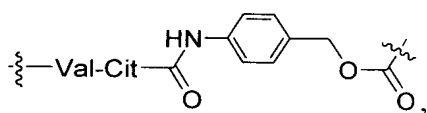
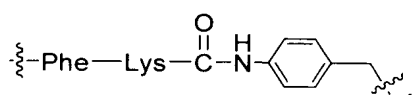
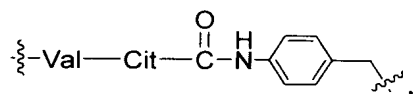
-Val-Cit-,

-Gly-Phe-Leu-Gly-,

-Ala-Leu-Ala-Leu-,

5

-Phe-Lys-,



10

-Val-Cit-C(=O)-CH₂OCH₂-C(=O)-,

-Val-Cit-C(=O)-CH₂SCH₂-C(=O)-, e

-NHCH(CH₃)-C(=O)-NH(CH₂)₆-C(CH₃)₂-C(=O)-

em que,

Y₁₁₋₁₉ são independentemente O, S ou NR₄₈;

15

R₃₁₋₄₈, R₅₀₋₅₁ e A₅₁ são independentemente selecionado dentre hidrogênio, C₁₋₆ alquilas, C₃₋₁₂ alquilas ramificadas, C₃₋₈ cicloalquilas, C₁₋₆ alquilas substituídas, C₃₋₈ cicloalquilas substituídas, arilas, arilas substituídas, aralquilas, C₁₋₆ heteroalquilas, C₁₋₆ heteroalquilas substituídas, C₁₋₆ alcóxi, fenóxi e C₁₋₆ heteroalcóxi;

Ar é uma porção arila ou heteroarila;

20

L₁₁₋₁₅ são independentemente espaçadores bifuncionais selecionados;

J e J' são independentemente selecionados dentre porções ativamente transportadas para uma célula alvo, porções hidrofobicas, porções ligantes bifuncionais e combinações destes;

(c11), (h11), (k11), (l11), (m11) e (n11) são independentemente números inteiros

25

positivos selecionados, preferencialmente 1;

(a11), (e11), (g11), (j11), (o11) e (q11) são independentemente tanto zero ou um número inteiro positivo, preferencialmente 1; e

(b11), (x11), (x'11), (f11), (i11) e (p11) são independentemente zero ou um.

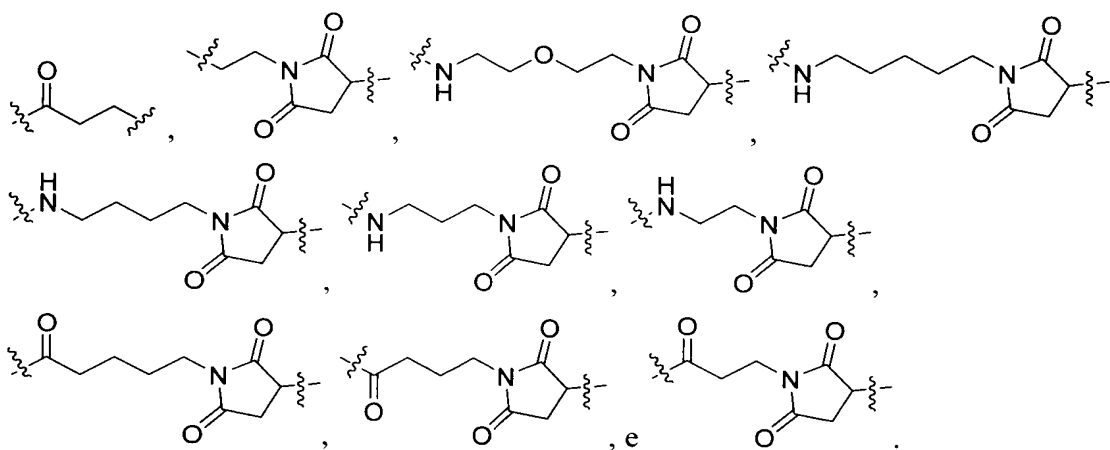
Vários ligantes lábeis, baseados em eliminação de benzila ou baseados em triálquila bloqueadas são descritos, por exemplo, nas patentes US Nos. 6.180.095, 6.720.306, 5.965.119, 6.624.142 e 6.303.569, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Os ligantes baseados em bicina são também descritos nas patentes US Nos. 7.122.189 e 7.087.229 e nos pedidos de patente US Nos. 10/557.522, 11/502.108 e 11/011.818, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

Preferencialmente, os compostos biologicamente ativos incluindo oligonucleotídeos são ligados a porções poliméricas dos compostos aqui descritos por meio de ligantes ácidos lábeis. Sem se prender a nenhuma teoria, os ligantes ácidos lábeis facilitam a liberação de oligonucleotídeos dos compostos poliméricos dentro de células e especificamente no lisossoma, endossoma ou macropinosoma.

2. Ligantes permanentes

Em aspectos preferidos da invenção, a porção direcionadora tal como SCA é ligada ao ligante multifuncional por um ligante permanente. Os ligantes permanentes são capazes de se conjugar a porções direcionadoras e ao ligante multifuncional. Um ligante permanente preferido pode ser uma molécula contendo maleimidila que pode prover uma ligação tio-éter.

Os ligantes permanentes contendo grupos maleimidila podem ser selecionados dentre:



Numa modalidade alternativa, os ligantes permanentes incluem estruturas correspondendo a aquelas mostradas acima, mas ao invés de um grupo maleimidila, tendo grupos tais como vinila, resíduos de sulfona, amino, carbóxi, mercapto, hidrazide, carbamato a semelhantes ao invés de maleimidila.

5

G. GRUPOS DE SAÍDA E GRUPOS FUNCIONAIS

Em alguns aspectos, grupos de saída apropriados incluem, sem limitação, halogênios (Br, Cl), carbonato ativado, carbonilimidazol, imida-tione cíclica, isocianato, N-hidroxisuccinimidila, para-nitrofenóxi, N-hidroxiftalimida, N-hidroxibenzotriazolil, imidazol, 10 tosilato, mesilato, tresilato, nosilato, C₁-C₆ alquilóxi, C₁-C₆ alcanoióxi, arilcarbonilóxi, orto-nitrofenóxi, N-hidroxibenzotriazolil, imidazol, pentafluorofenóxi, 1,3,5-triclorofenóxi, e 1,3,5-trifluorofenóxi ou outros grupos de saída apropriados que serão evidentes para um técnico no assunto.

Para os fins da presente invenção, grupos de saída devem ser entendidos como grupos 15 capazes de reagir com um nucleofilo encontrado no alvo desejado, i.e. uma porção biologicamente ativa e uma porção direcionadora.

Em algumas modalidades preferidas, grupos funcionais para serem ligados aos sistemas de transporte polimérico incluem maleimidila, vinila, resíduos de sulfona, amino, carbóxi, mercapto, hidrazida, carbazato e semelhantes, que podem ainda ser conjugados a um 20 grupo ativo ou grupo direcionador.

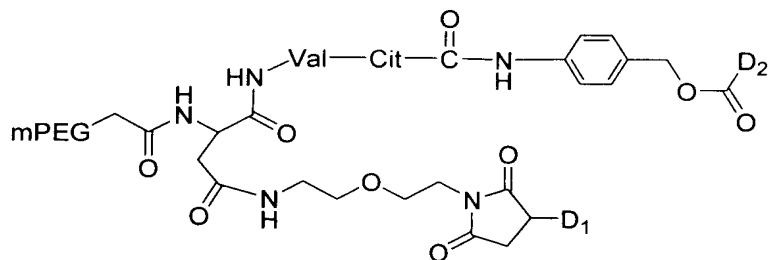
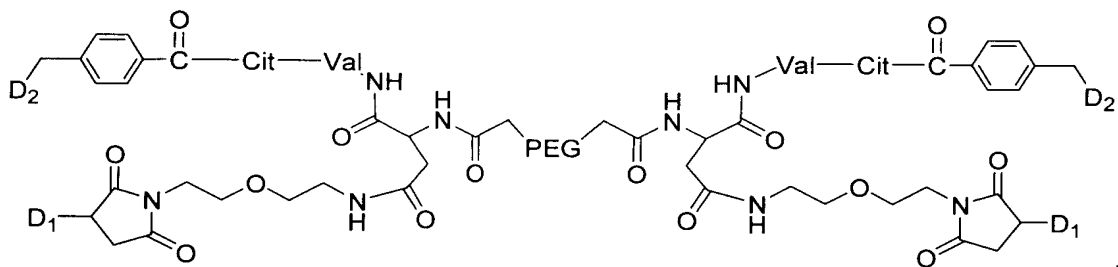
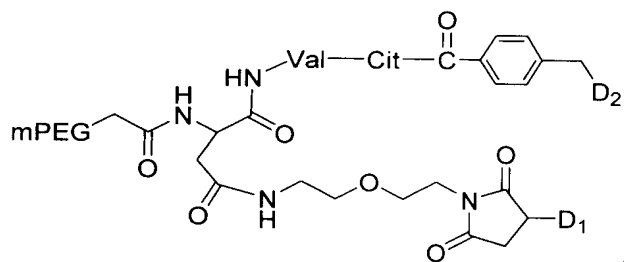
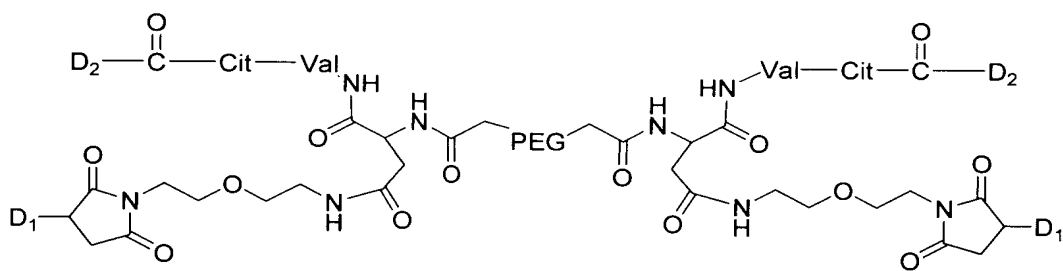
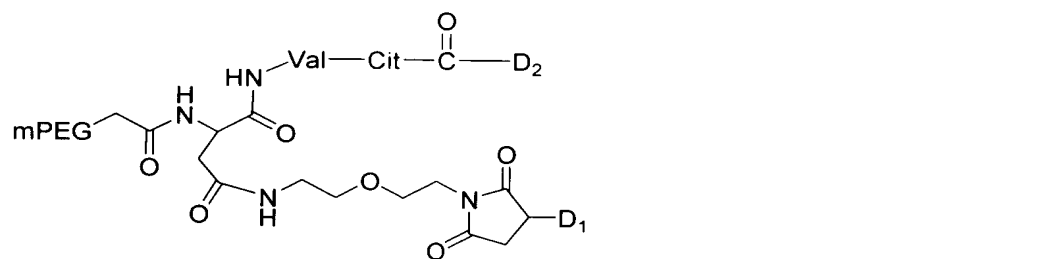
Para os fins da presente invenção, quando D₁ ou D₂ são grupos funcionais, os grupos L₁ e L₃ não são porções funcionais.

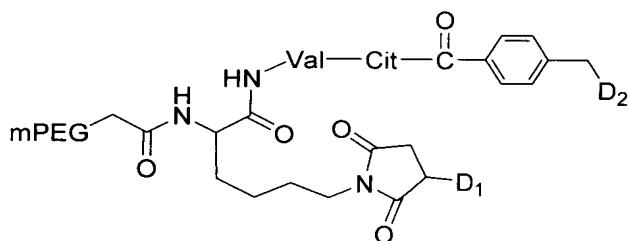
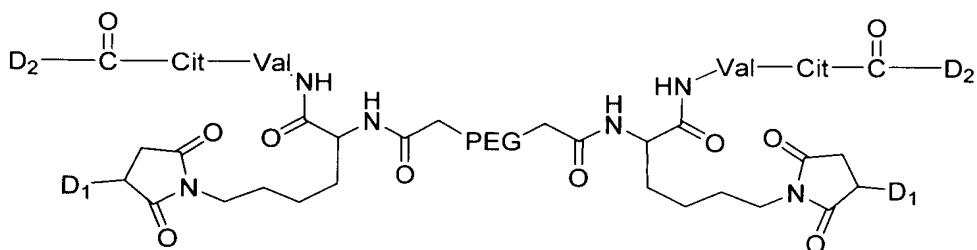
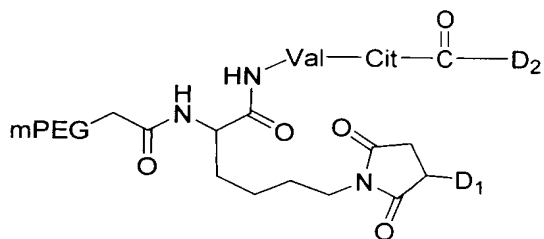
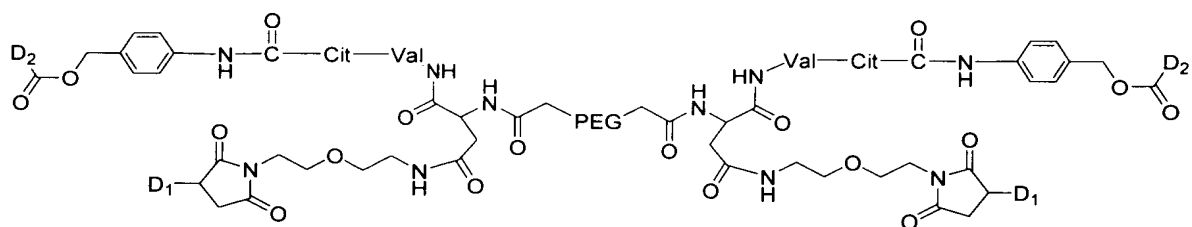
Numa modalidade preferida, o grupo funcional pode ser maleimidila e os grupos de saída podem ser selecionados dentre OH, metóxi, tert-butóxi, para-nitrofenóxi e N- 25 hidroxisuccinimidila.

H. MODALIDADES PREFERIDAS CORRESPONDENDO A FÓRMULA (I)

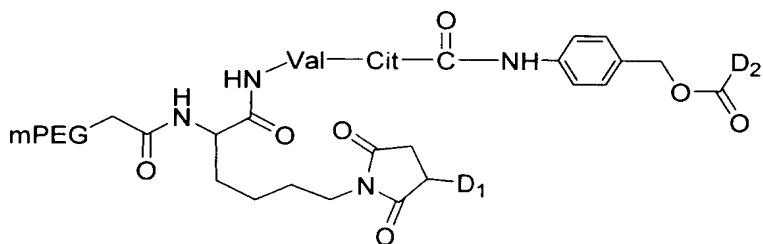
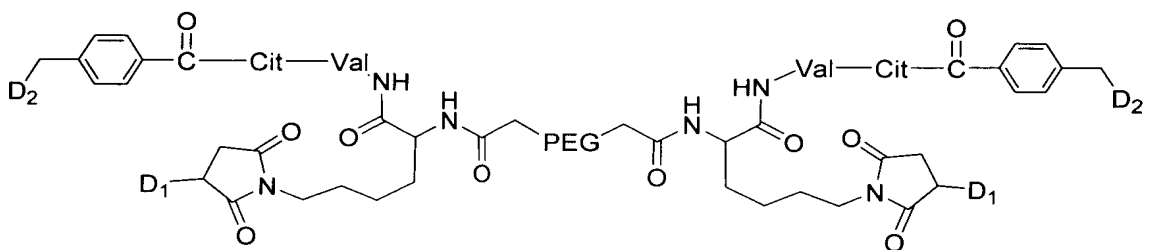
Algumas modalidades particulares preparadas pelos métodos aqui descritos incluem:

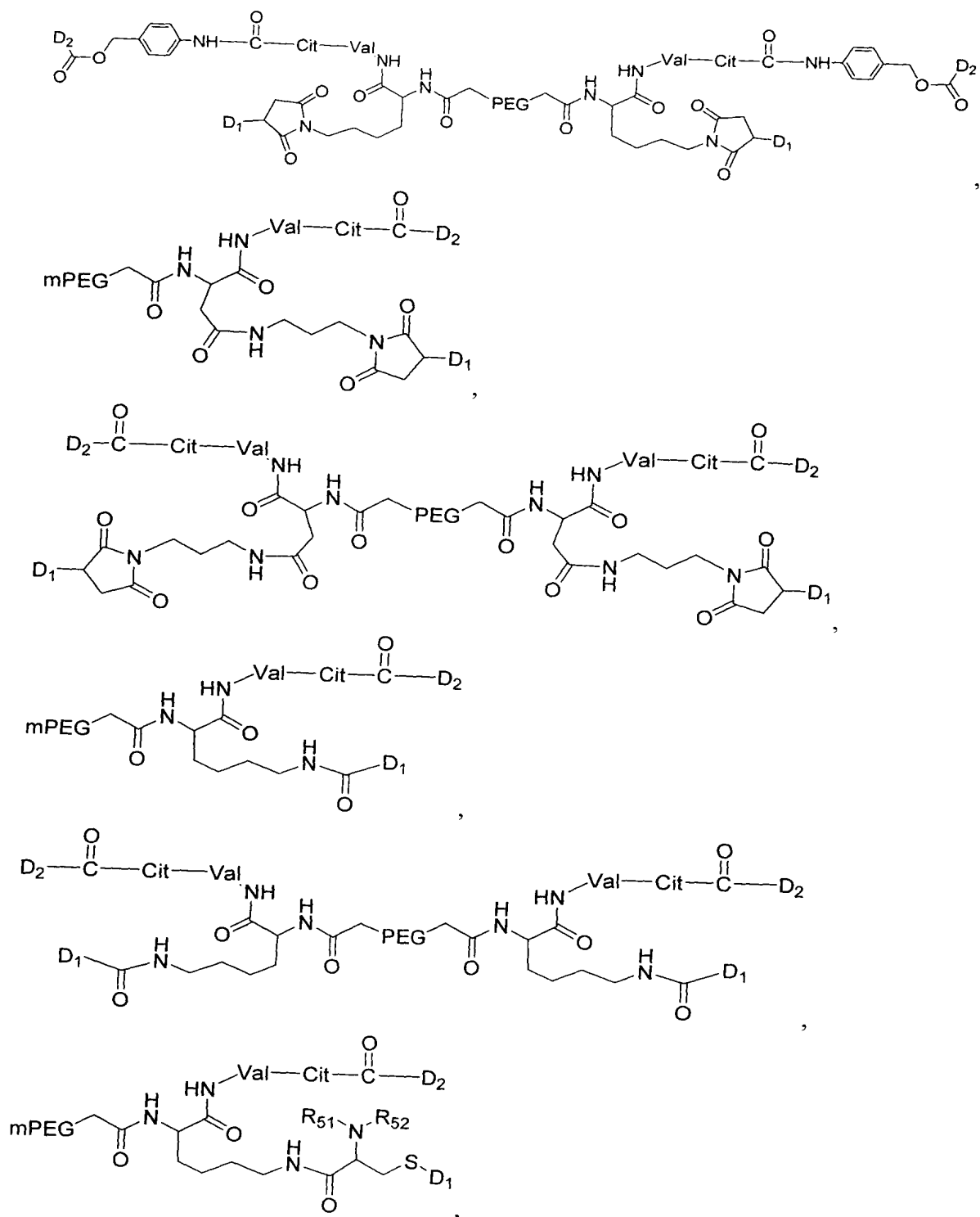
30



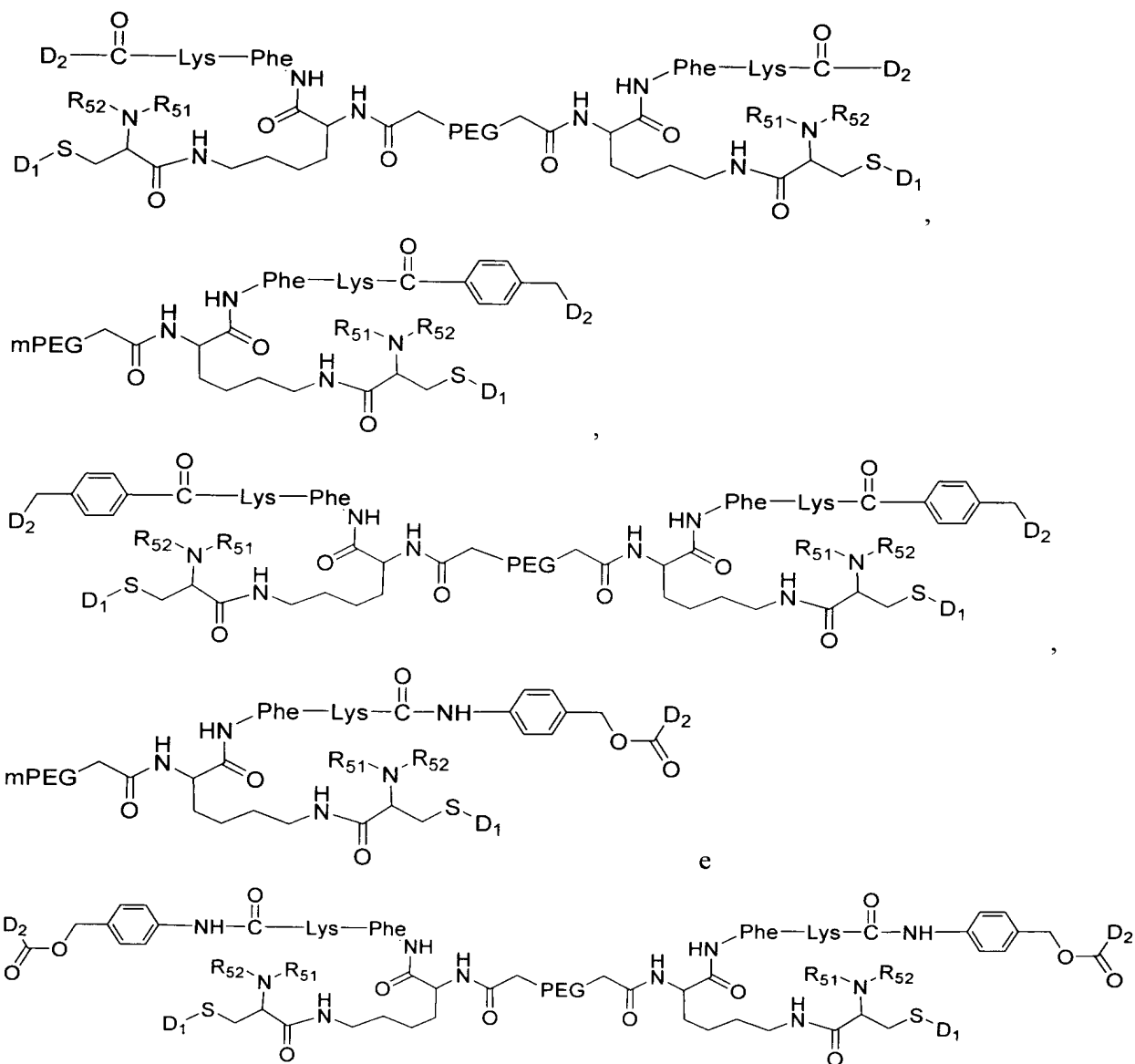


5









em que

mPEG tem Fórmula: $\text{CH}_3\text{-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-}$;

10

PEG tem Fórmula $\text{-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-}$;

(n) é um número inteiro positivo de cerca de 10 a cerca de 2.300;

R_{51} e R_{52} são independentemente selecionados dentre hidrogênio, C_{1-6} alquilas, C_{3-12} alquilas ramificadas, C_{3-8} cicloalquilas, C_{1-6} alquilas substituídas, C_{3-8} cicloalquilas

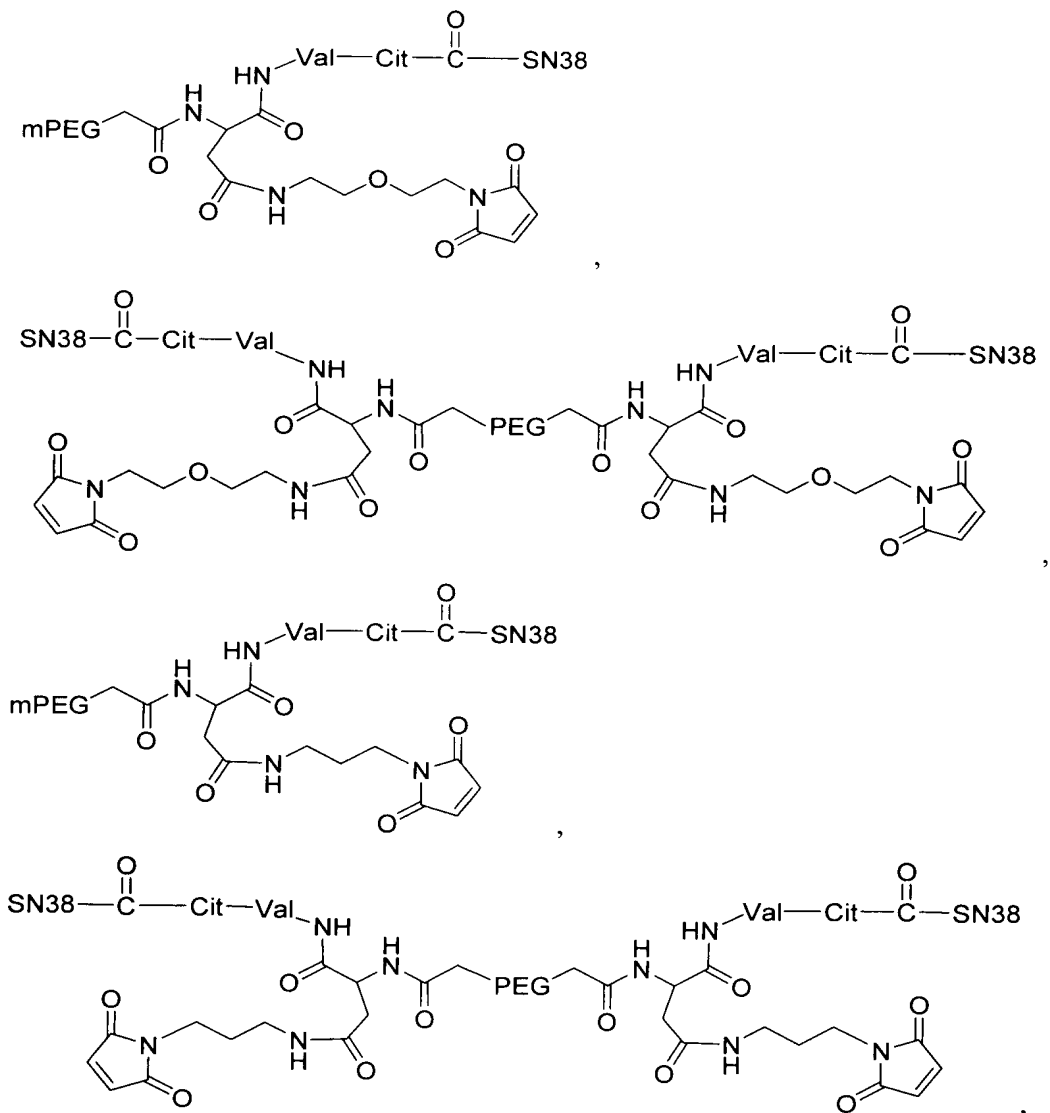
substituídas, arilas, arilas substituídas, aralquilas, C₁₋₆ heteroalquilas, C₁₋₆ heteroalquilas substituídas, C₁₋₆ alcóxi, C₁₋₆ alquiloxicarbonila, ariloxicarbonil, fenóxi e C₁₋₆ heteroalcóxi;

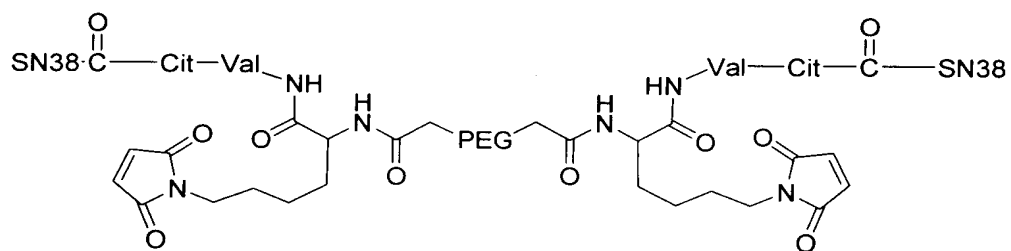
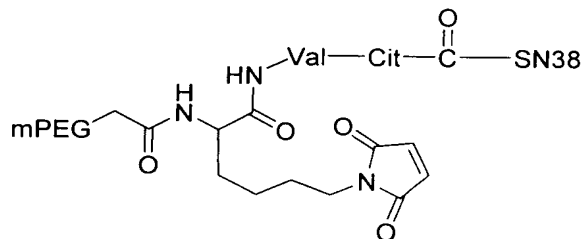
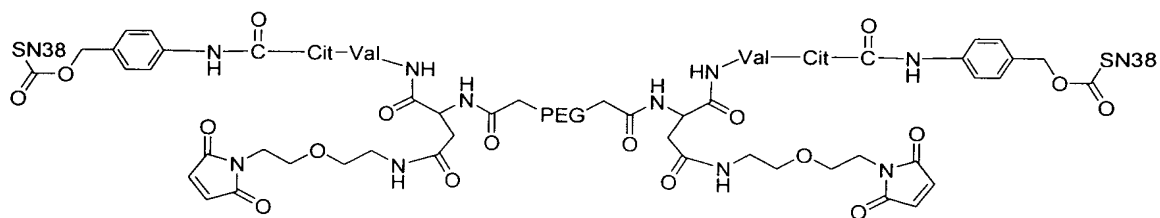
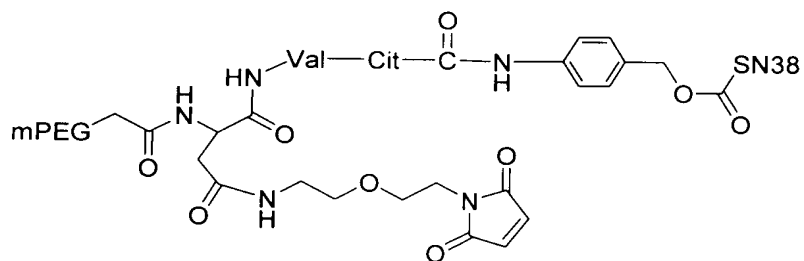
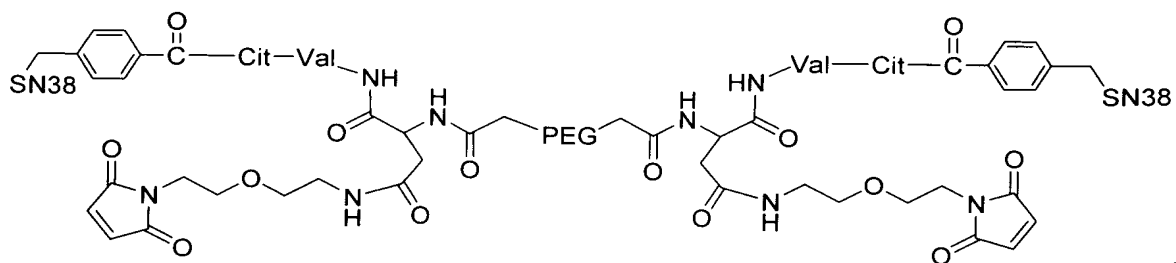
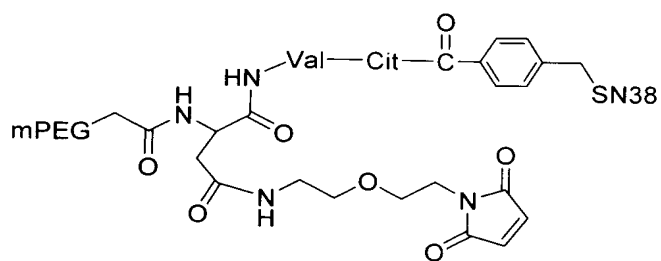
D₁ é uma porção direcionadora, um grupo funcional ou um grupo de saída; e

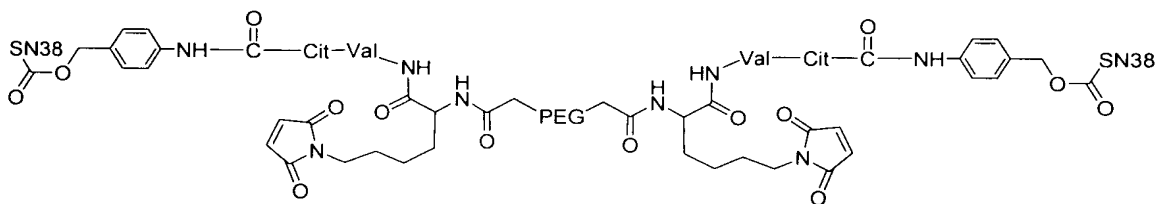
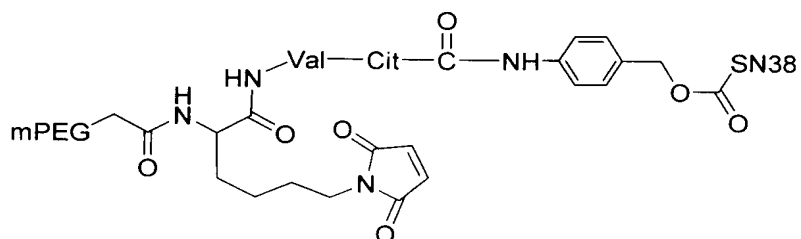
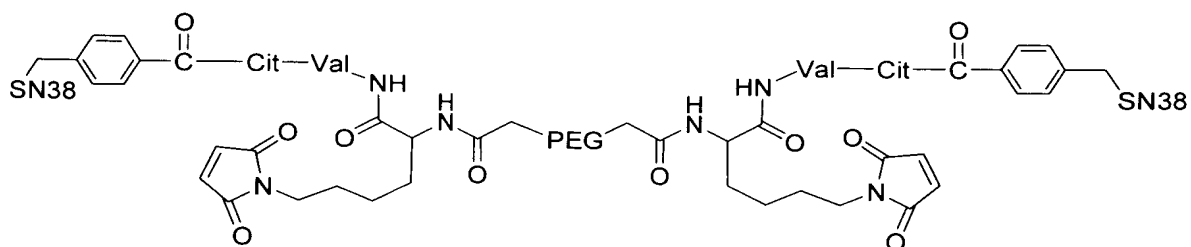
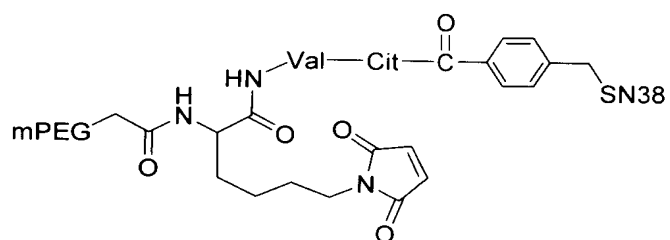
D₂ é uma porção biologicamente ativa, um grupo funcional ou um grupo de saída.

5

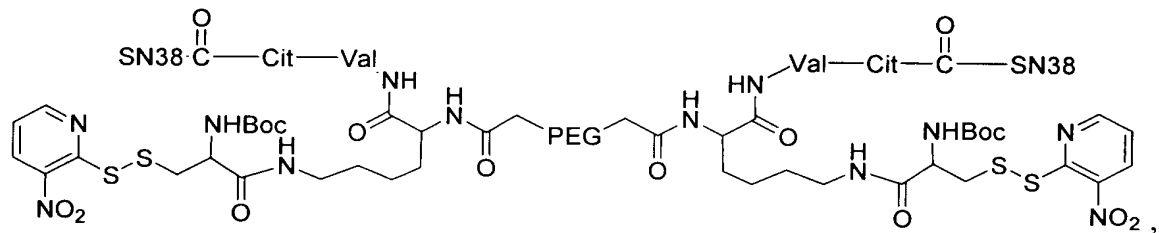
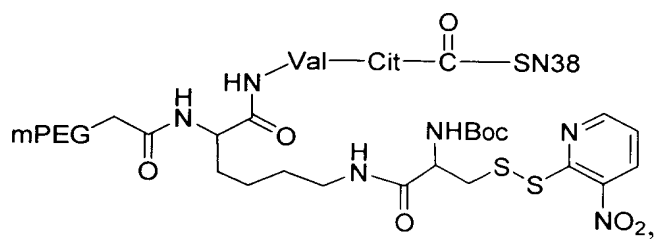
Compostos poliméricos preferidos de acordo com a presente invenção incluem:

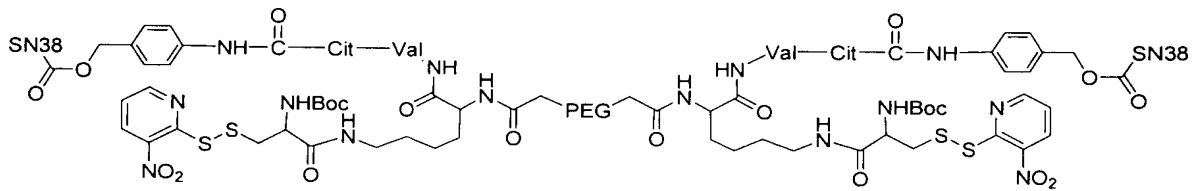
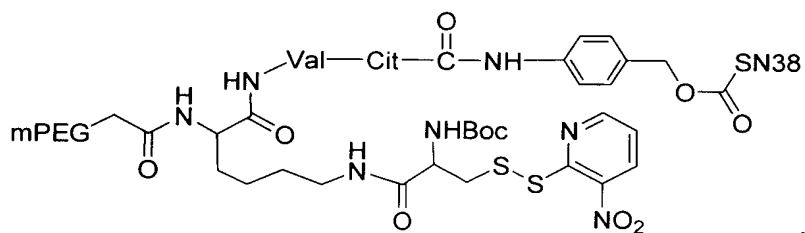
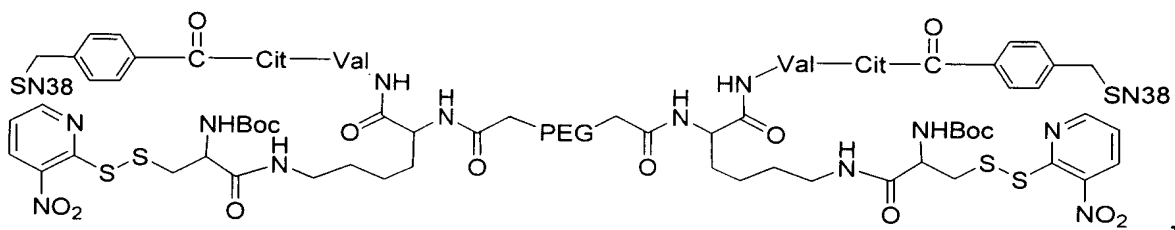
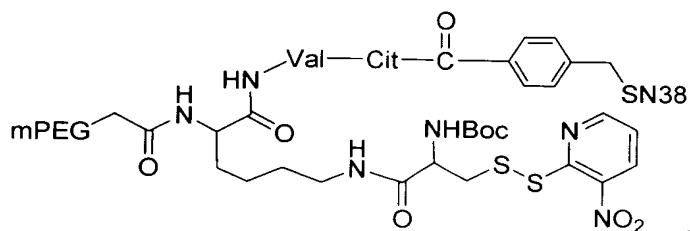




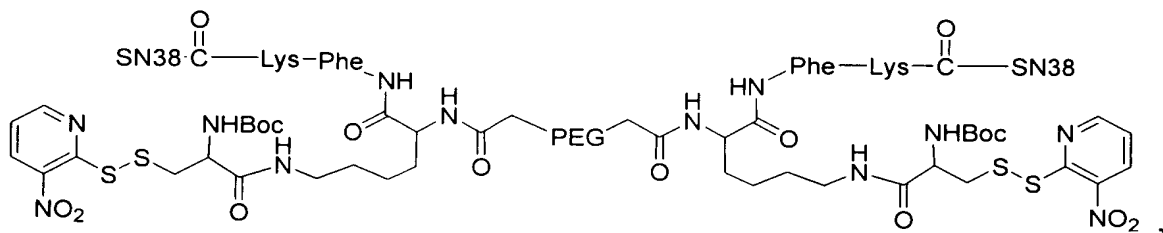
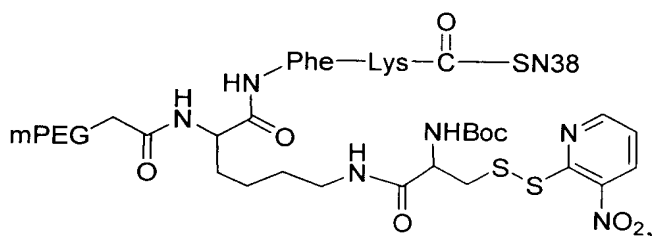


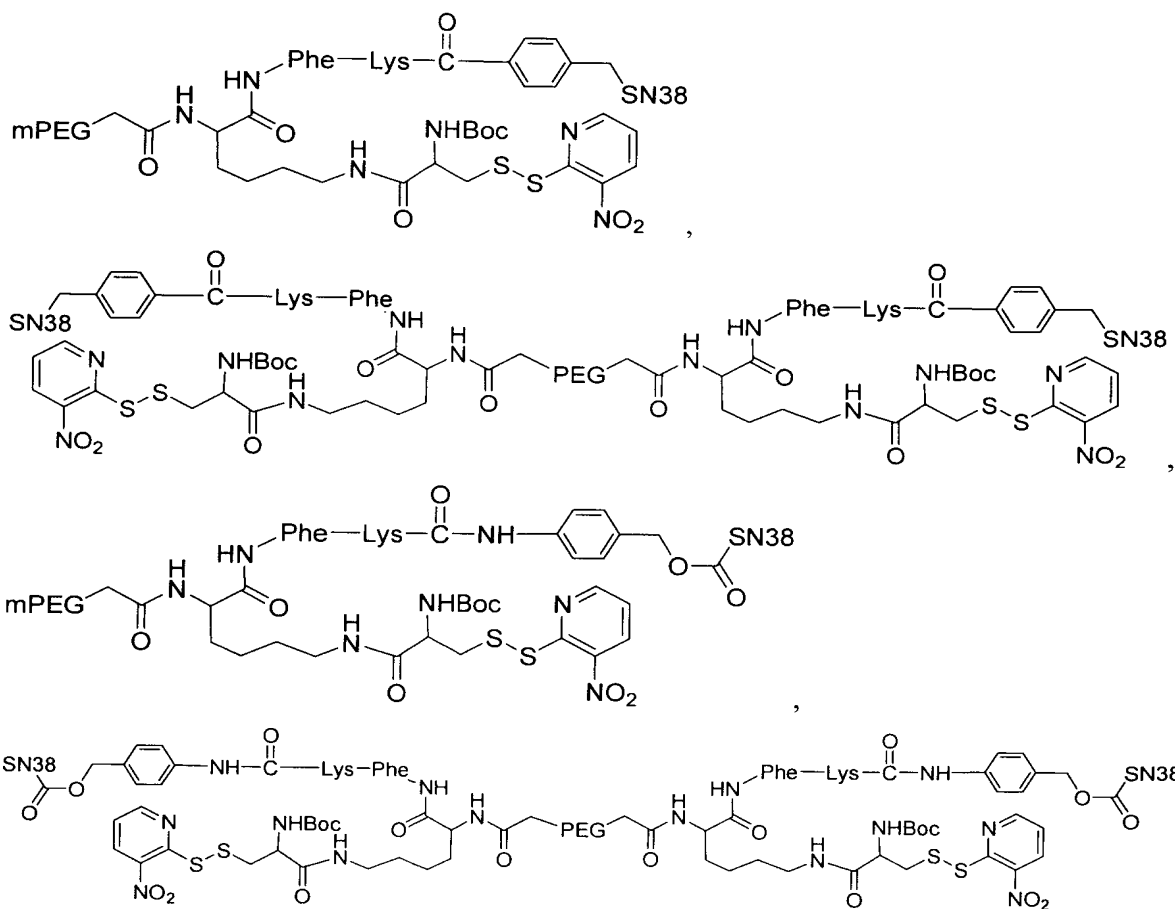
5



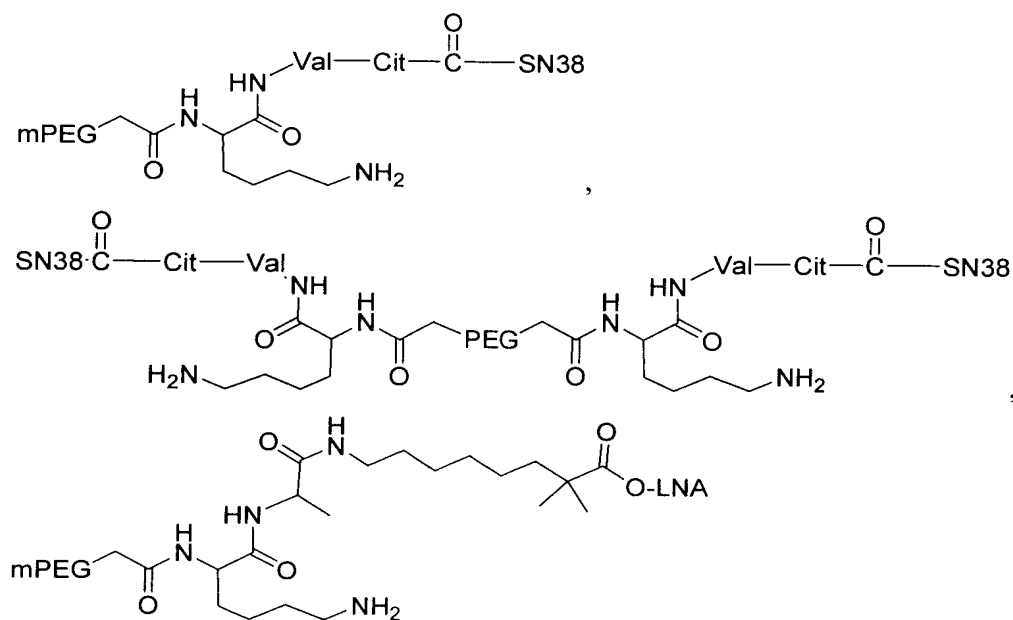


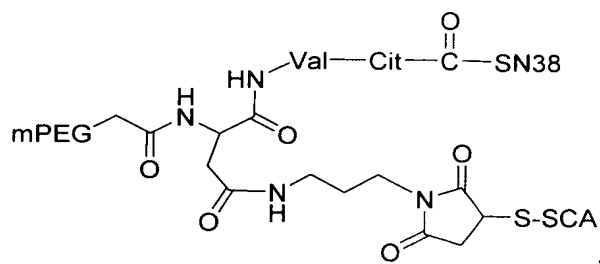
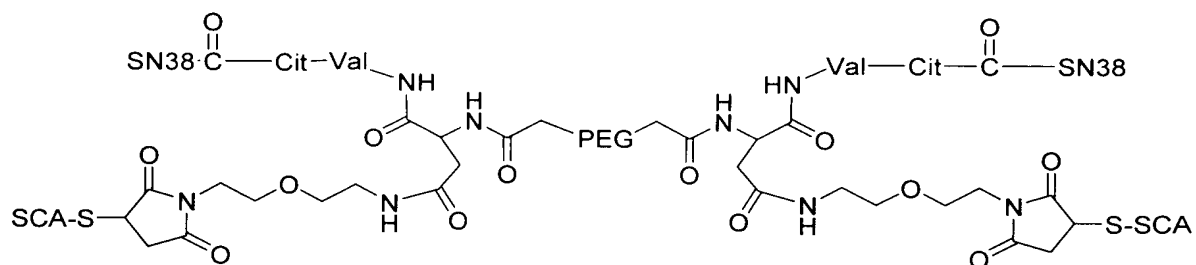
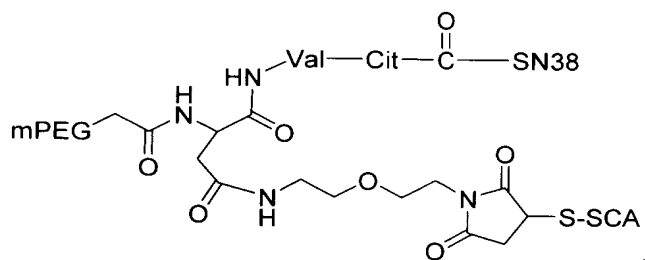
5

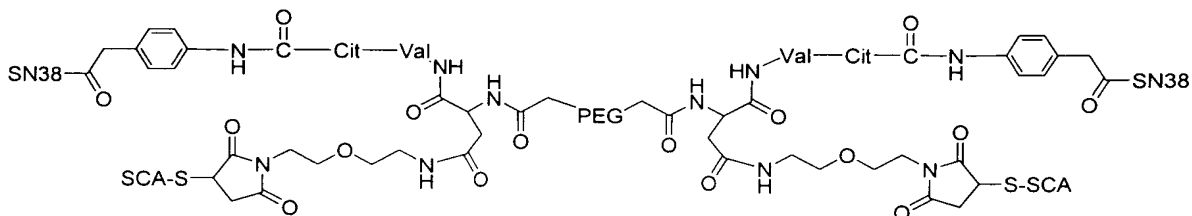
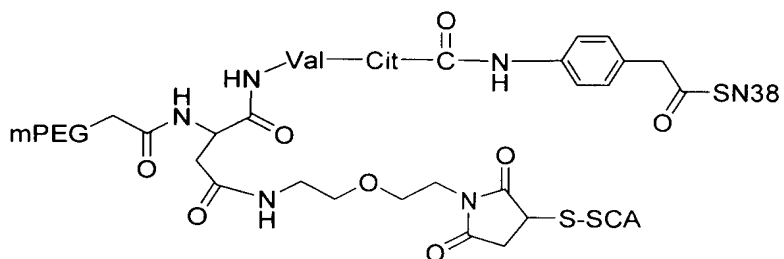
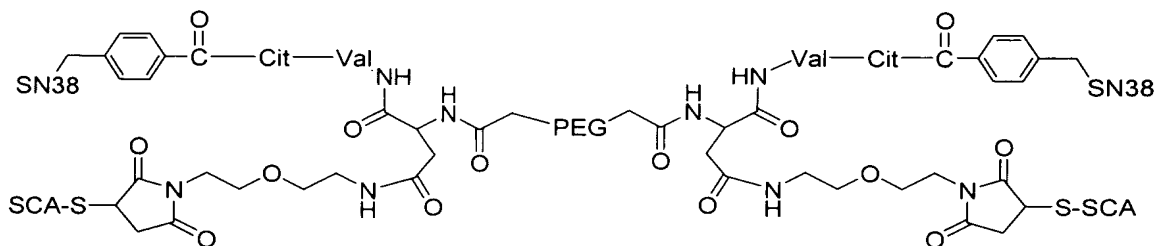
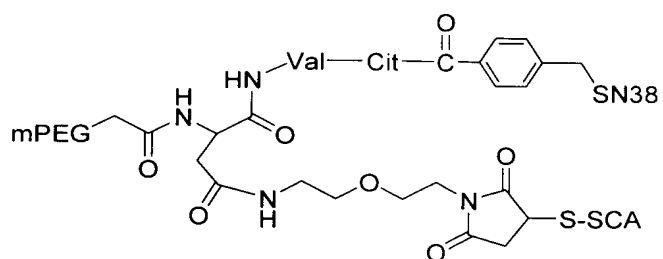




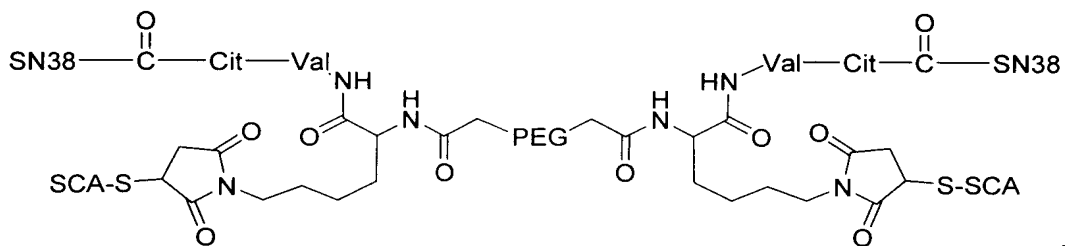
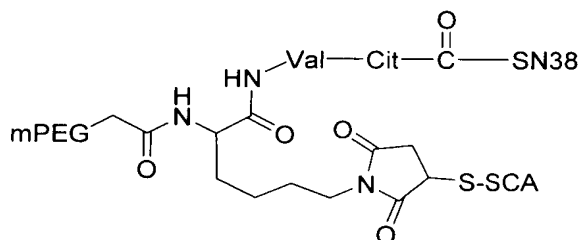
5

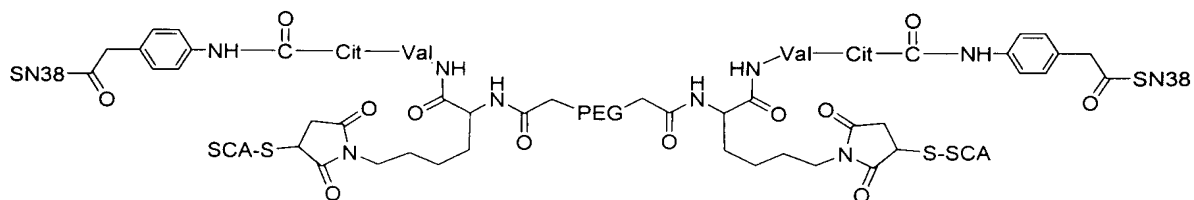
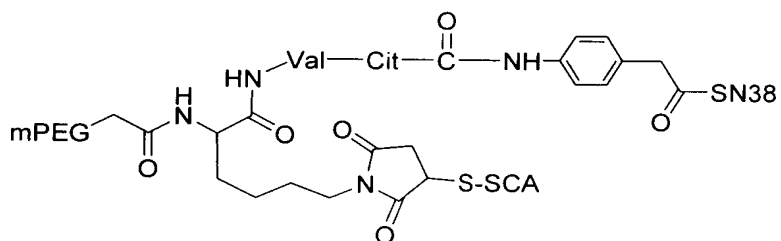
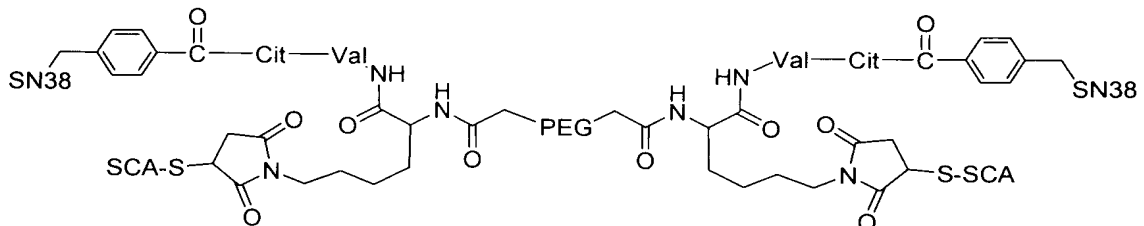


[illegible]

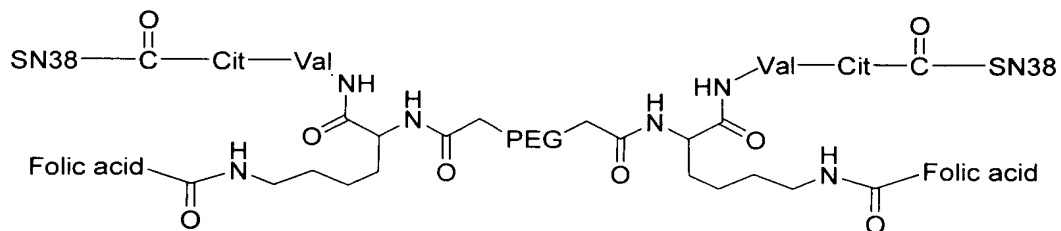


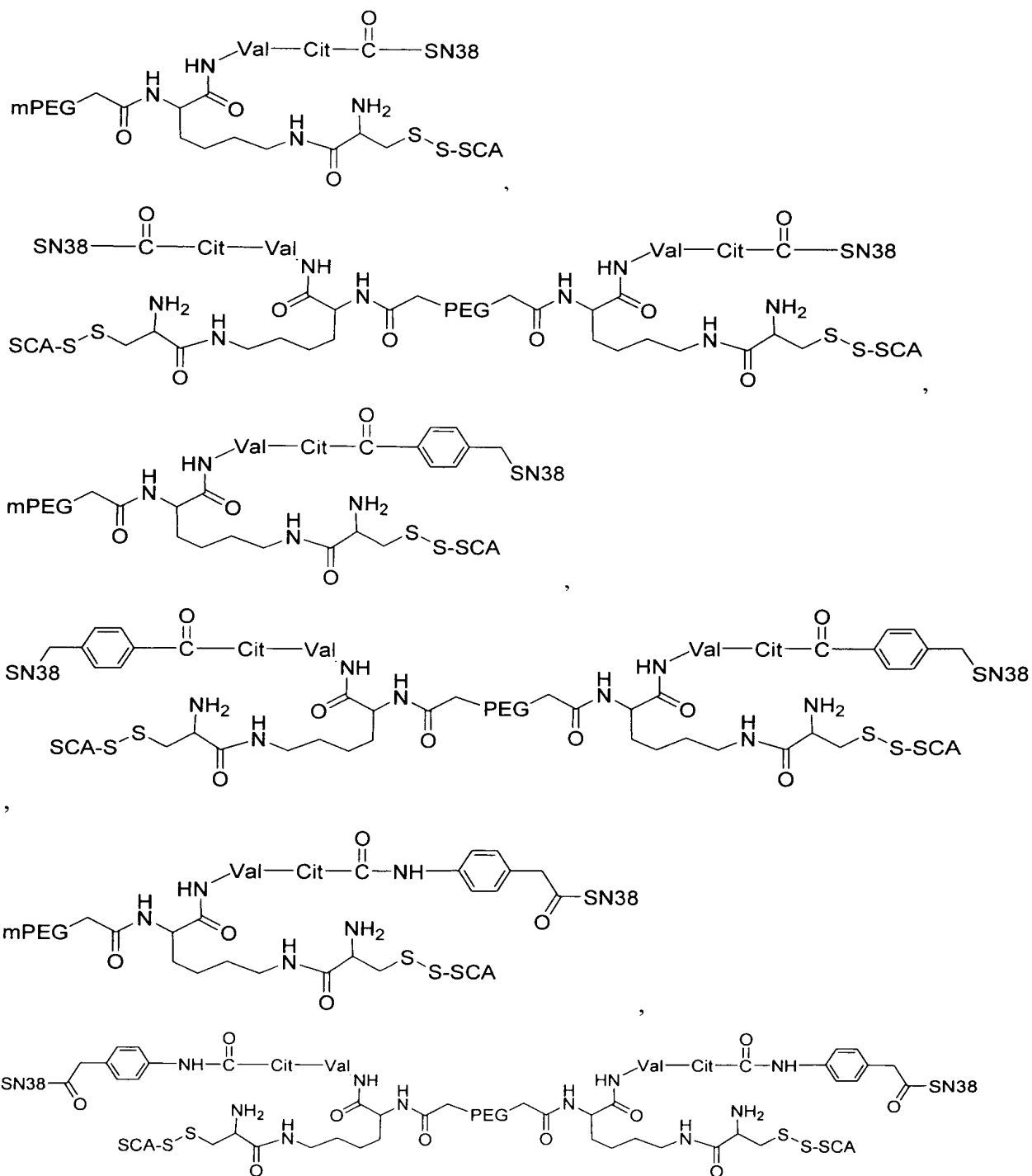
5

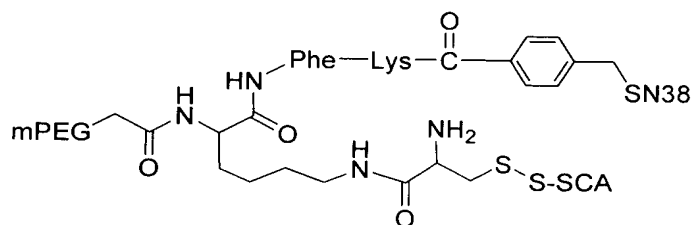
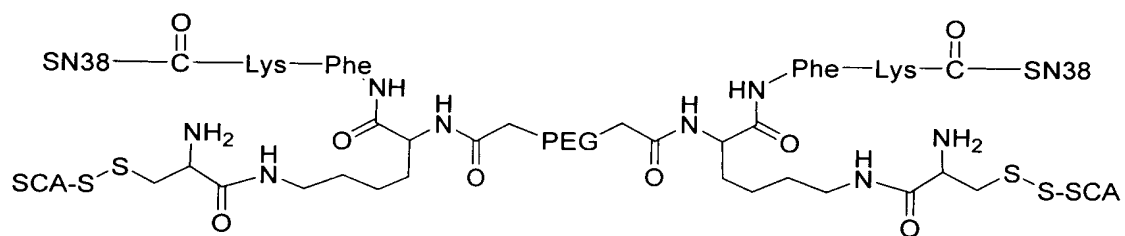
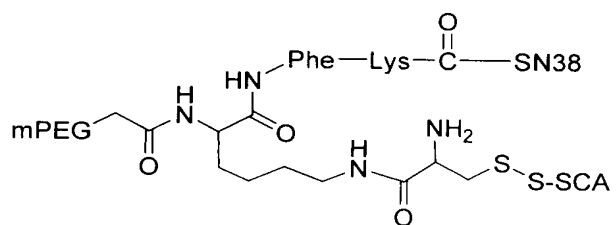
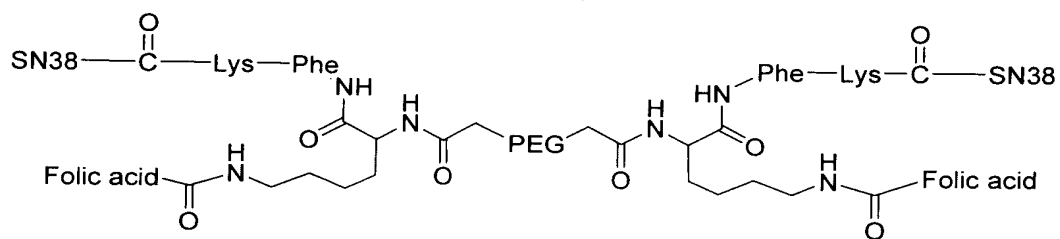
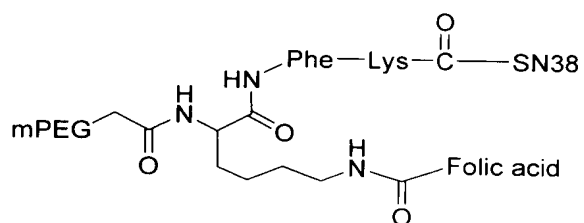


C(CCCNC(=O)c1cccnc1)C(=O)NCCOCm

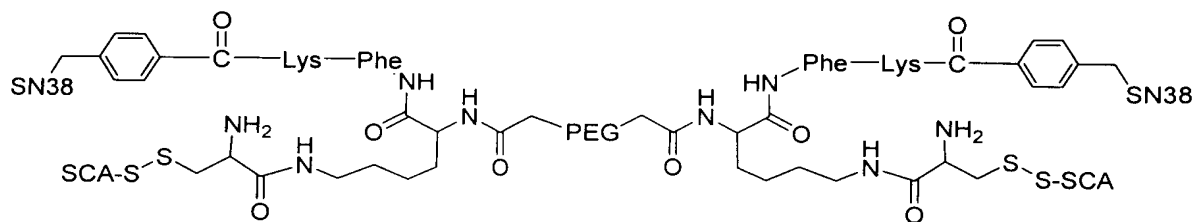
The diagram illustrates the chemical structure of the mPEG-Val-Cit-SN38-Folic acid conjugate. It features a central peptide backbone consisting of Valine (Val), Citrulline (Cit), and SN38 linked by amide bonds. The N-terminus of the Valine residue is attached to a methoxy polyethylene glycol (mPEG) chain via an amide linkage. The C-terminus of the SN38 residue is connected to a folic acid molecule through another amide bond.

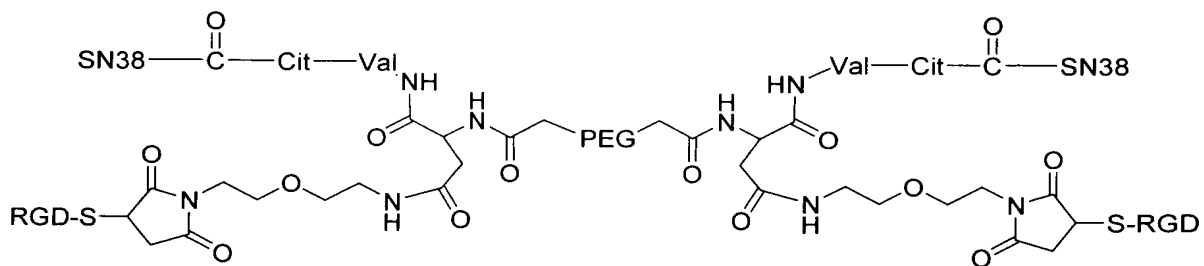
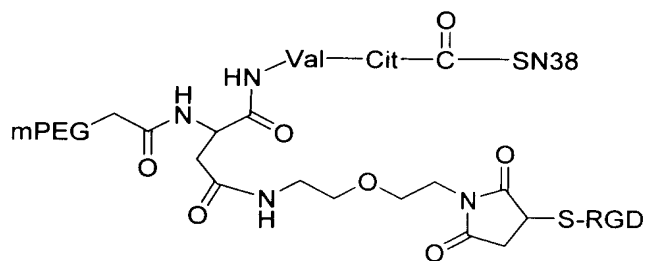
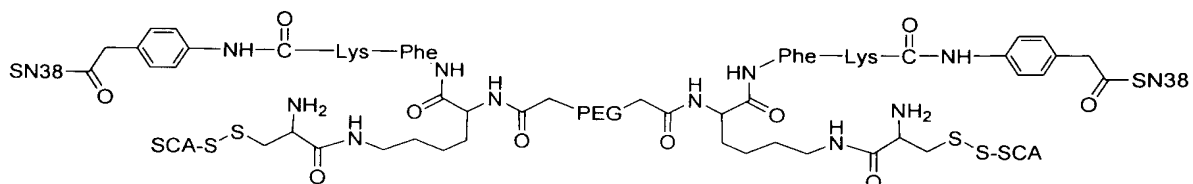
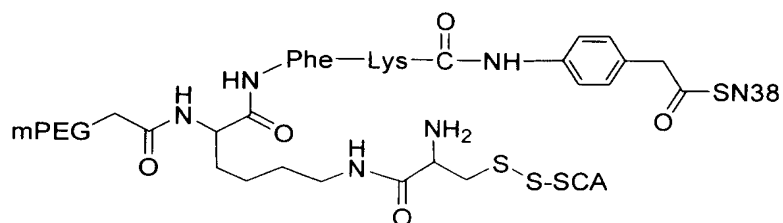




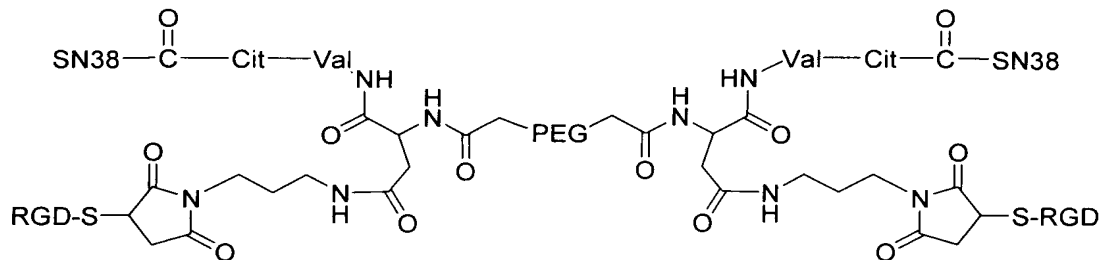
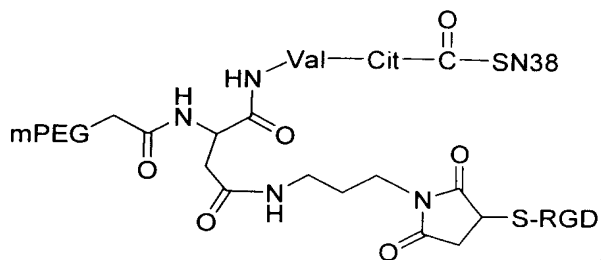


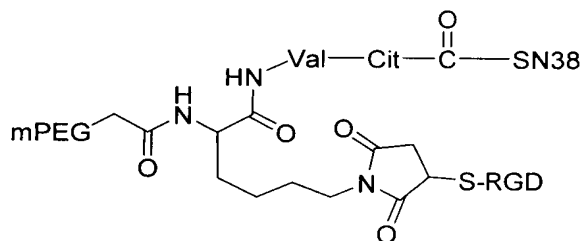
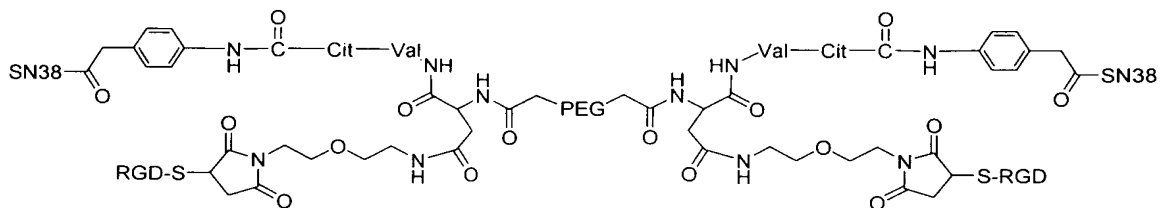
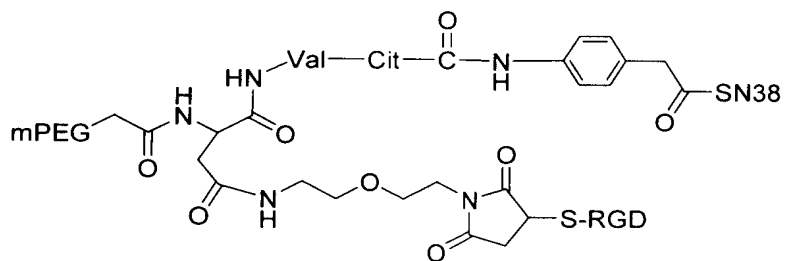
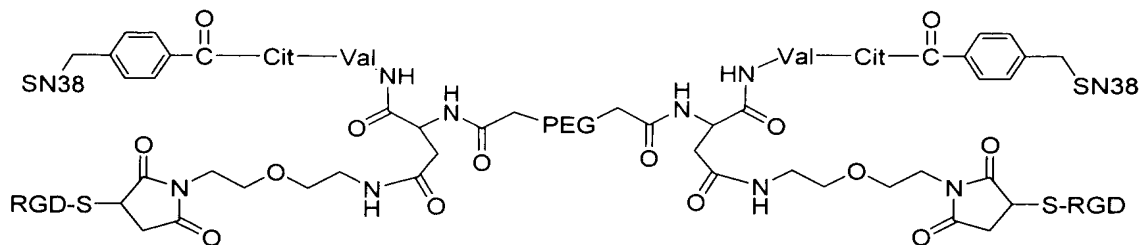
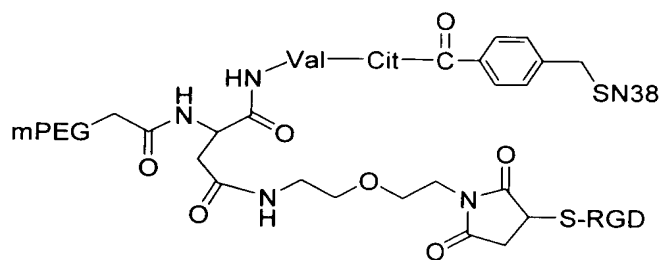
5



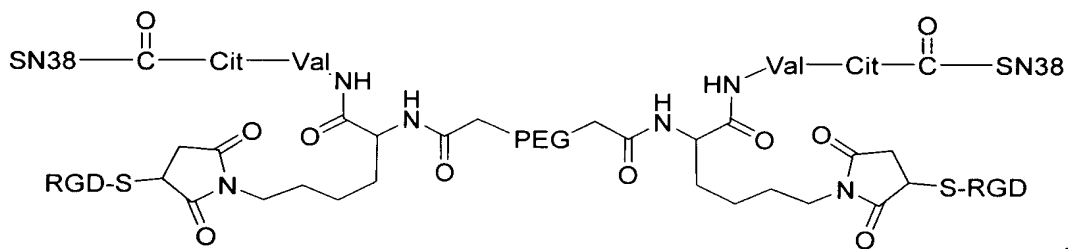


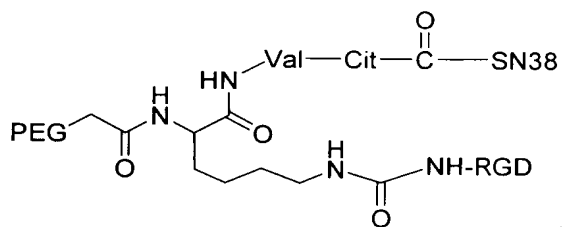
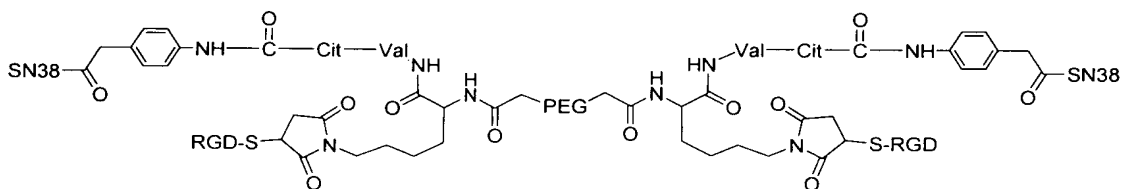
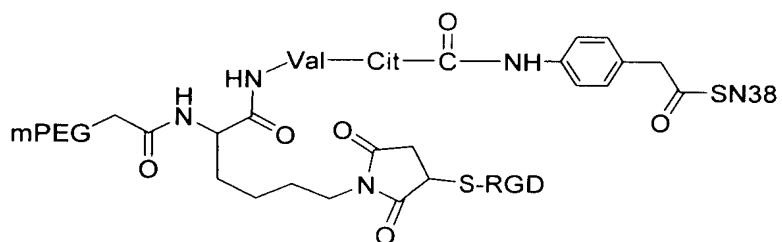
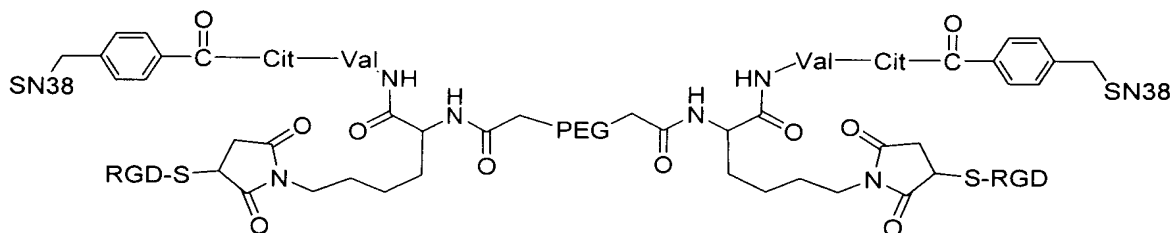
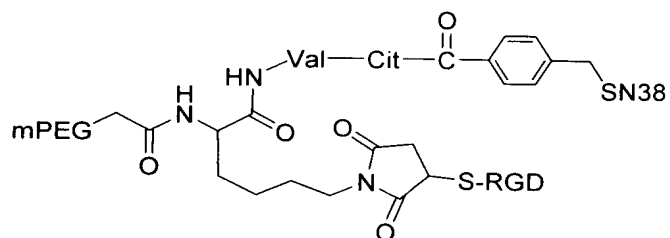
5



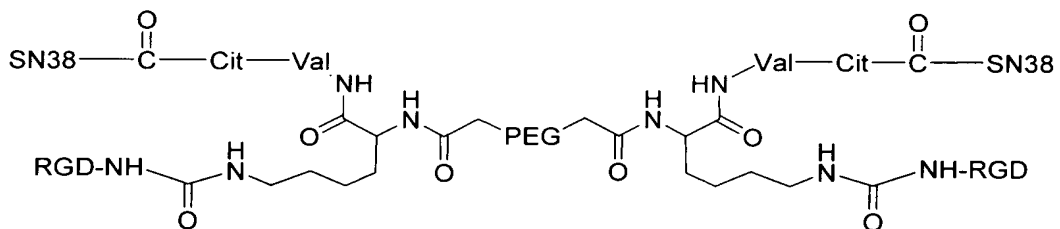


5

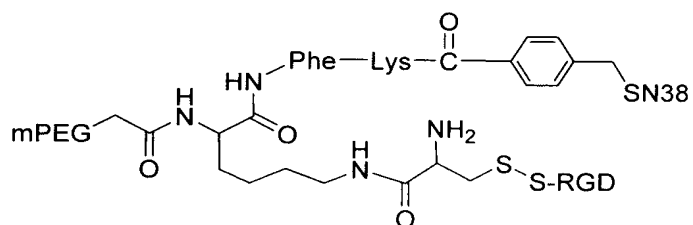
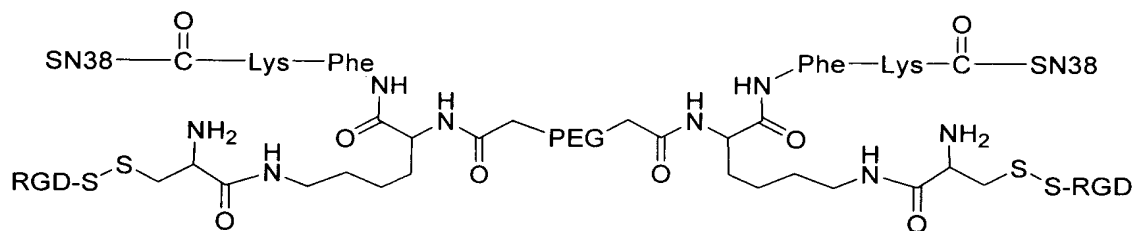
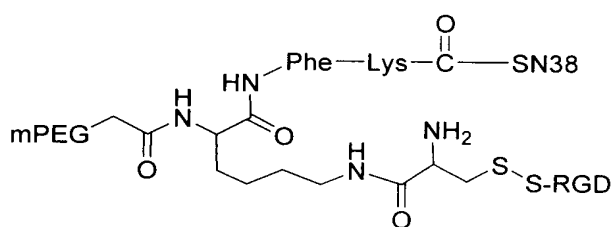
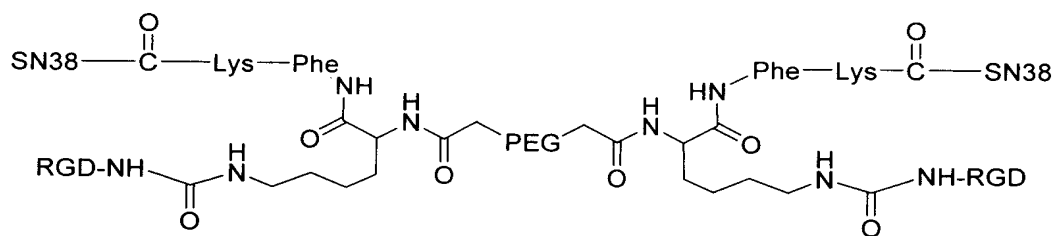
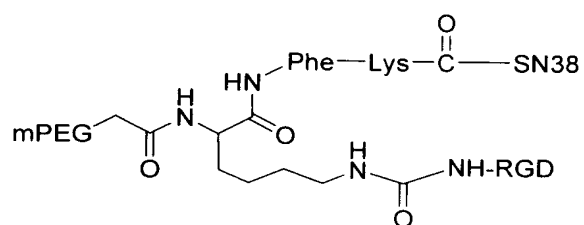




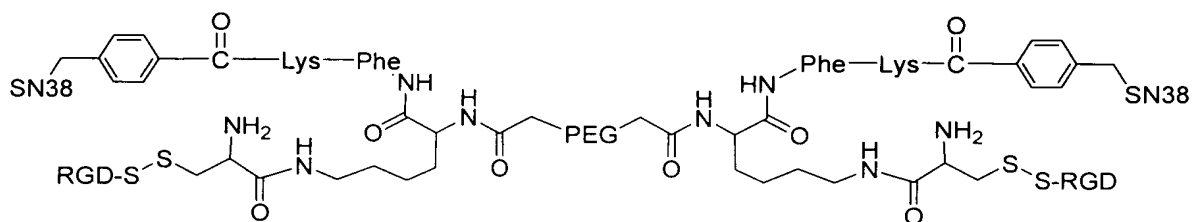
5

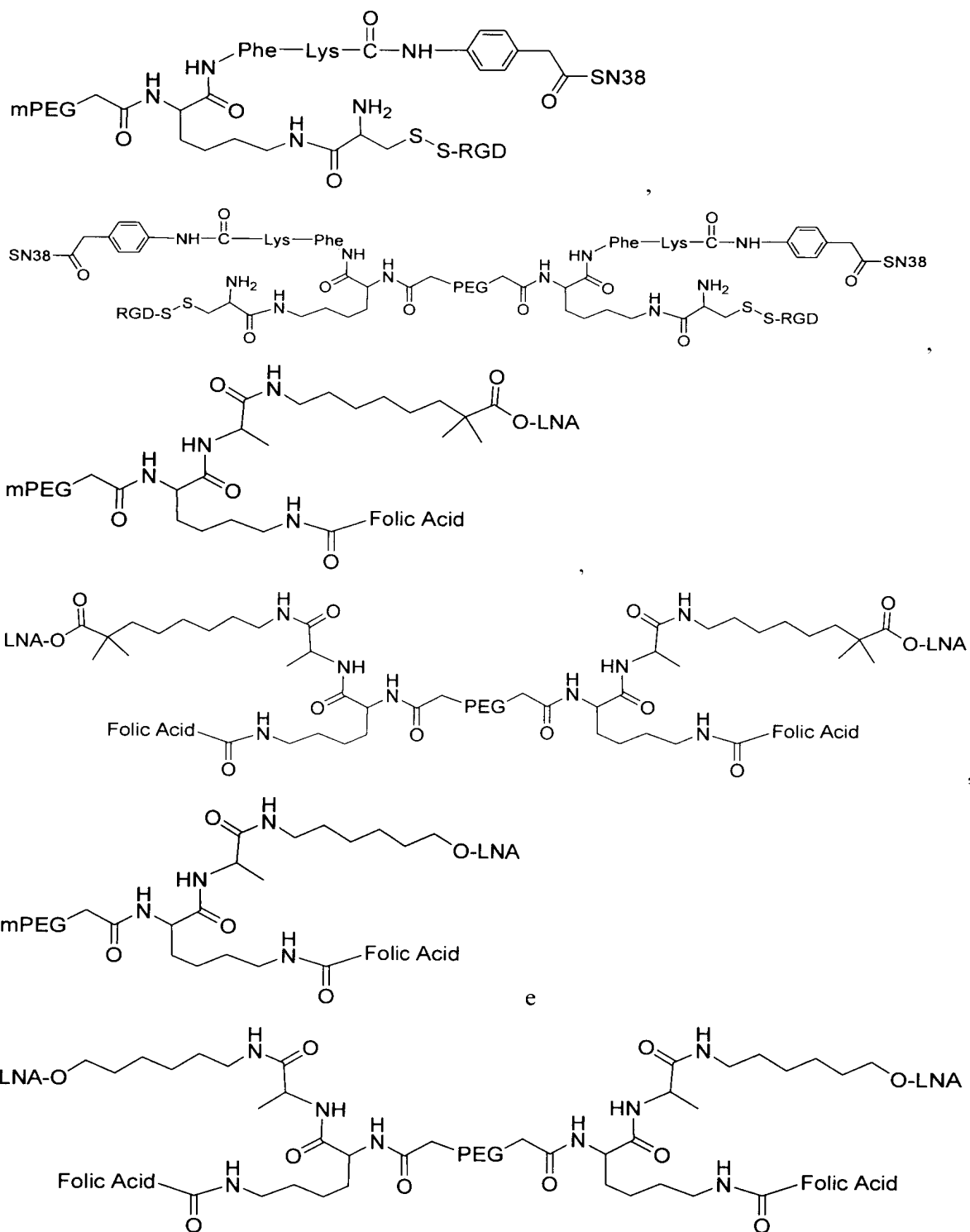






5

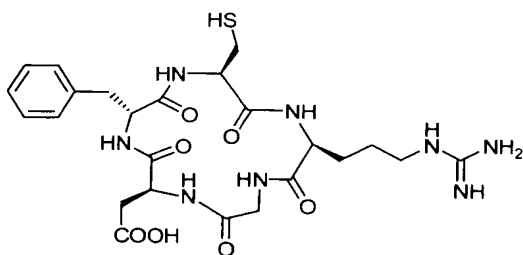




em que

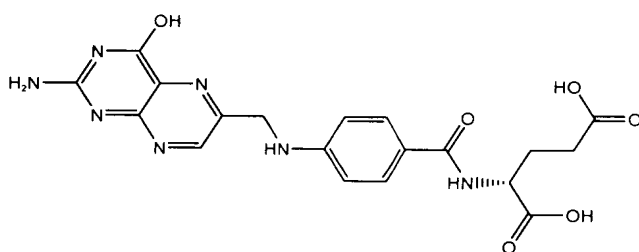
S-SCA é um anticorpo de cadeia simples;

RGD é



LNA é ácido nucleico bloqueado;

“Folic acid” é o resíduo de



SN38 é 7-etil-10-hidroxicamptotecina;

mPEG tem Fórmula: $\text{CH}_3\text{-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-}$;

PEG tem Fórmula $\text{-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-}$; e

(n) é um número inteiro positivo de cerca de 10 a cerca de 2.300.

I. MÉTODOS PARA PREPARAR OS CONJUGADOS

Geralmente, os conjugados podem ser feitos pela adição seqüencial de polímero, agente citotóxico e porção direcionadora ao ligante multifuncional. A ordem exata de adição não é limitada a esta ordem e, como será evidente para um técnico no assunto, existem aspectos onde o PEG será adicionado primeiro ao ligante multifuncional, seguido pela adição do agente direcionador tal como um anticorpo monoclonal. Detalhes relativos a alguns aspectos preferidos desta modalidade são apresentados nos Exemplos abaixo.

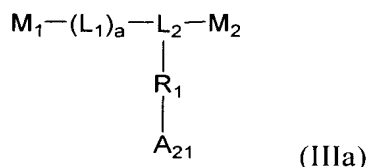
Em um aspecto da invenção, o composto polimérico tendo um ligante multifuncional pode ser preparado pela conjugação de um composto polimérico tendo um grupo OH ou um grupo de saída terminal com um nucleófilo contendo um agente citotóxico ligado por meio de um ligante opcional. O técnico no assunto poderá utilizar menor quantidade de nucleófilo quando comparado ao número de grupos de saída no polímero para formar um intermediário

contendo tanto agente citotóxico e grupos de saída. Este intermediário pode ainda reagir com uma porção direcionadora para formar o conjugado polimérico multi-substituído com agente citotóxico e agente direcionador. Alternativamente, o polímero pode ser ativado com grupos diferentes para dar reatividades químicas diferentes frente a várias porções nucleofílicas. Por exemplo, grupos de proteção diferentes tais como tert-Bu éster e éster metílico de terminais de ácidos carboxílicos podem ser desprotegidos seletivamente e passo-a-passo para gerar vários graus de grupos ativos para serem conjugados com agentes biologicamente ativos tais como agentes citotóxicos e agentes direcionadores. Como mostrado na FIG. 1, o grupo maleimidila e éster succinimidilico podem reagir seletivamente com porções contendo SH ou NH₂, respectivamente.

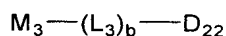
Todas as reações químicas aqui descritas são reações com condições e etapas necessárias conhecidas de um técnico no assunto. As reações sintéticas aqui descritas não necessitam de experimentação desnecessária.

Os métodos para preparar conjugados poliméricos contendo ligantes multifuncionais compreendem:

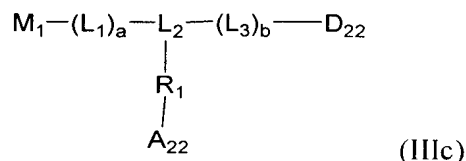
Reagir um composto de Fórmula (IIIa):



com um composto contendo uma porção biologicamente ativa de Fórmula (IIIb):



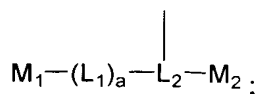
sob condições suficientes para formar um composto de Fórmula (IIIc):



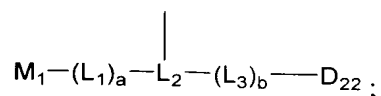
em que

R₁ é um polímero hidrossolúvel substancialmente não-antigênico;

A₂₁ é um grupo de proteção ou



A_{22} é um grupo de proteção ou



M_1 é um grupo funcional;

D_{22} é uma porção biologicamente ativa;

5 M_2 é OH ou um grupo de saída;

M_3 é OH, NH_2 , ou SH;

L_1 é um ligante permanente ou um ligante lábil;

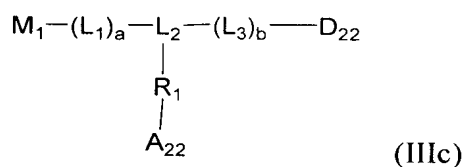
L_2 é um ligante multifuncional;

L_3 é um ligante permanente ou um ligante lábil; e

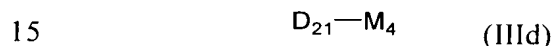
10 (a) e (b) são independentemente zero ou um número inteiro positivo.

Os métodos ainda incluem

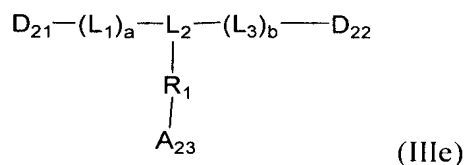
Reagir o composto de Fórmula (IIIc):



com uma porção contendo nucleófilo tendo Fórmula (IIId)

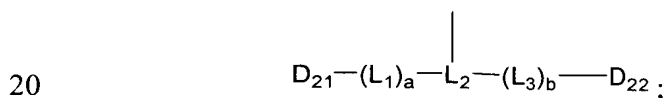


em condições suficientes para formar um composto de Fórmula (IIIe):



em que:

A_{23} é um grupo de proteção ou



M_1 é um functional group;

D_{21} é uma porção direcionadora; e

M_4 é OH, NH_2 , ou SH.

A ligação de um composto nucleofílico tal como os de Fórmula (IIIb) ao PEG ou outro polímero pode ser feita utilizando técnicas de síntese orgânica padrão bem conhecidas de um técnico no assunto. A porção polimérica ativada tal como SC-PEG, PEG-amina, ácidos PEG, etc. pode ser obtida tanto de fontes comerciais quanto ser sintetizada pelo técnico no assunto sem experimentação desnecessária.

A ligação de composto nucleofílico tal como os de Fórmula (IIIb) a porções poliméricas é preferencialmente conduzida na presença de um agente de acoplamento. Uma lista não-limitante de agentes de acoplamento inclui 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIPC), qualquer carbodiimida de dialquila, haletos de 2-halo-1-alquil-piridínio (reagentes de Mukaiyama), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil carbodiimida (EDC), anidrido cíclico de ácido propanofosfônico (PPACA) e fenil diclorofosfatos, etc. que são disponíveis, por exemplo, de fontes comerciais tais como Sigma-Aldrich Chemical, ou sintetizados utilizando técnicas conhecidas.

Preferencialmente, as reações são conduzidas em solvente inerte tal como diclorometano, clorofórmio, DMF ou misturas destes. As reações podem ser preferencialmente conduzidas na presença de uma base tal como dimetilaminopiridina (DMAP), diisopropiletilamina, piridina, trietilamina, etc. para neutralizar ácidos eventualmente gerados. As reações podem ser conduzidas em temperaturas de cerca de 0°C a cerca de 22°C (temperatura ambiente). Algumas modalidades particulares preparadas pelos métodos aqui descritos incluem:

H. MÉTODOS DE TRATAMENTO

Em aspectos alternativos da invenção, são também apresentados métodos para tratar um mamífero compreendendo administrar uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica contendo um composto da presente invenção de Fórmula (I) a um paciente com necessidade da mesma.

Em um aspecto preferido da invenção, são também providos métodos para tratar um paciente tendo uma neoplasia ou câncer, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica contendo um composto da presente invenção de Fórmula

(I) a um paciente com necessidade da mesma. Em alguns aspectos, o câncer sendo tratado pode ser um ou mais dos seguintes: tumores sólidos, linfomas, câncer de pulmão de célula pequena, leucemia linfócita aguda (ALL), câncer pancreático, glioblastoma, câncer de ovário, cânceres gástricos, etc. As composições são úteis para tratar doenças neoplásicas, reduzir o fardo do tumor, prevenir metástases ou neoplasmas e prevenir recorrências de tumor/crescimento neoplásico em mamíferos.

Um outro aspecto da presente invenção apresenta métodos de tratamento de varias condições médicas em mamíferos. Resumidamente, qualquer porção biologicamente ativa que possa ser ligada ao polímero PEG pode ser administrada a um mamífero com necessidade de tal tratamento. Qualquer oligonucleotídeo, etc. que tenha efeito terapêutico em seu estado não-conjugado pode ser utilizado em sua forma conjugada, feita como aqui descrito.

A quantidade de composição que será administrada vai depender da molécula precursora ali incluída. Geralmente, a quantidade de pro droga utilizada nos métodos de tratamento é uma quantidade que alcança eficazmente o resultado terapêutico em mamíferos. Naturalmente, as doses de vários compostos por drogas variarão dependendo do composto precursor, razão de in vivo, peso molecular do polímero, etc. um técnico no assunto determinara a dose ótima dos conjugados de transporte poliméricos baseando-se na experiência clinica e na indicação de tratamento. As dosagens verdadeiras serão evidentes para um técnico no assunto sem experimentação desnecessária.

Os compostos da presente invenção podem ser incluídos em uma ou mais composições farmacêuticas para administração em mamíferos. As composições farmacêuticas podem ser com base em uma solução, suspensão, tablete, cápsula ou semelhante, preparadas de acordo com métodos bastante conhecidos no estado da técnica. Também é contemplado que tais composições podem ser para vias orais e/ou parenterais, dependendo das necessidades do técnico no assunto. Uma solução e/ou suspensão da composição pode ser utilizada, por exemplo, como um veículo para injeção ou infiltração da composição por meio de técnicas conhecidas no estado da técnica, e.g., injeção intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea e semelhantes. Tal administração pode também ser por infusão em um orifício ou cavidade, assim como por inalação ou vias intranasais. Em

aspectos preferidos da invenção, entretanto, os conjugados poliméricos são administrados parenteralmente a mamíferos com necessidade dos mesmos.

Em ainda um aspecto da presente invenção, são providos métodos para administrar polinucleotídeos (oligonucleotídeos), preferencialmente oligonucleotídeos antisenso a células de mamíferos. Os métodos incluem transportar uma quantidade efetiva do conjugado preparado como aqui descrito para a condição sendo tratada e dependerão da eficácia dos polinucleotídeos para tais condições. Por exemplo, se o oligonucleotídeo não-conjugado (por exemplo BCL2 oligonucleotídeos antisenso, Survivin-oligonucleotídeos antisenso) possuir eficácia contra certos cânceres ou células neoplásicas, o método vai incluir transportar um conjugado polimérico contendo os oligonucleotídeos a células tendo susceptibilidade aos oligonucleotídeos nativos. O transporte pode ser feito *in vivo*, como parte de uma composição apropriada, ou diretamente a células num ambiente *ex vivo*. Em um tratamento particular, os conjugados poliméricos incluindo oligonucleotídeos (SEQ ID NO. 1, SEQ ID NOs: 2 e 3, e SEQ ID NO: 4) podem ser utilizados.

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir servem para melhor compreensão da invenção mas não são, de maneira nenhuma, restritores do escopo da invenção. Os números em negrito citados nos Exemplos correspondem aos mostrados na Fig. 1. Abreviações foram utilizadas em todos os exemplos, tais como DCC (diciclohexilcarbodiimida), DCM (diclorometano), DCU (Diciclohexilureia), DIEA (diisopropiletilamina), DIPC (diisopropilcarbodiimida), DMAP (4-dimetilaminopiridina), DMF (N,N'-dimetilformamida), DSC (disuccinimidil carbonato), EDC (1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil carbodiimida), EEDQ (2-etoxi-1-etoxycarbonil-1,2-dihidroquinolina), IPA (isopropanol), NHS (N-hidroxisuccinimida), NMM (N-metilmorfolina), PEG (polietileno glicol), SCA-SH (anticorpo de cadeia simples), SN38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), TBDPS (tert-butil-dipropilsilil), e TEA (triethylamina).

Procedimentos Gerais. Todas as reações foram conduzidas em atmosfera de nitrogênio seco ou argônio. Reagentes comerciais foram utilizados sem posterior purificação. Todos os compostos PEG foram secos *in vacuo* ou por destilação azeotrópica com tolueno antes do uso. Espectros de RMN¹H foram obtidos em 300 MHz e os de RMN¹³C em 75,46 MHz

utilizando um espectrômetro Varian Mercury 300 e clorofórmio deuterado foi utilizado como solvente a não ser que especificado em contrario. Deslocamentos químicos (δ) foram reportados em partes por milhão (ppm) a partir do deslocamento do tetrametil silano (TMS).

5 **Método de HPLC.** A mistura reacional e a pureza dos intermediários e produtos finais foram monitorados em um instrumento Beckman Coulter System Gold[®] HPLC. Ele emprega uma coluna de fase reversa ZORBAX[®] 300SB C8 (150 × 4,6 mm) ou Phenomenex Jupiter[®] 300A C18 (150 x 4,6 mm) com detetor UV 168 Diode Array, usando gradiente de 10-90 % de acetonitrila 0,05 % de ácido trifluoroacético (TFA) em razão de fluxo de 1 mL/min.

10

Exemplo 1. N-(Metoxycarbonil)maleimida (composto 1).

Metilcloroformato (4,4 mL, 56,7 mmol, 1 eq) foi adicionado a uma solução de maleimide (5,5 g, 56,7 mmol, 1 eq) e NMM (6,2 mL, 56,7 mmol, 1 eq) em 200 mL of EtOAc em 0°C. A suspensão foi agitada a 0°C por 30 minutos, filtrada e lavada com EtOAc. O filtrado e as
15 lavagens foram combinados e lavados com água fria sob Na₂SO₄ anidro. Depois da filtração e evaporação sob vácuo, um sólido rosa foi obtido. Purificação por cromatografia em coluna com sílica gel (Hexano-EtOAc, 1:1, v/v) deu o produto (4,8 g, 55%).

Exemplo 2. N^E-Maleoil- α -(Boc)-L-lisina (composto 2).

20 N-(Metoxycarbonil)maleimida (315 mg, 2,03 mmol, 1 eq) foi adicionado a uma solução de Boc-L-lisina (500 mg, 2,03 mmol, 1 eq) em 10 mL de NaHCO₃ aquoso saturado a 0°C. A mistura foi agitada vigorosamente a 0°C por 40 minutos em temperatura ambiente por mais uma hora. Depois de resfriada a 0°C, a solução foi acidificada a pH 3,0 com H₂SO₄ concentrado antes de extração com acetato de etila. As fases orgânicas foram combinadas e
25 secas sob MgSO₄ anidro. Depois da remoção do solvente *in vacuo*, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna com sílica gel utilizando uma mistura de CHCl₃-MeOH (5:1, v/v) para dar o produto (458 mg, 69%): RMN¹H δ 1,39-1,87 (6 H, m, (CH₂)₃), 1,44 (9H, s, Boc), 3,52 (2H, t, J = 7,2 Hz, NCH₂), 4,25-4,30 (1H, m, CH), 5,15 (1H, d, NH), 6,70 (2H, s, maleimide).

30

Exemplo 3. N^E-Maleoil- α -L-lisina (composto 3).

Uma solução de N^E-maleoil- α -(Boc)-L-lisina (172 mg, 0,53 mmol) em 5 mL de DCM anidro foi tratada com 10 mL de solução 2N HCl em éter etílico por uma hora em temperatura ambiente antes da adição de 10 mL de éter etílico anidro. O sólido resultante foi filtrado para dar um rendimento de 82 mg (59%) do sal de HCl de N^E-Maleoil- α -L-lisina: RMN¹H (CD₃OD) δ 1,36-1,54 (2 H, m, CH₂), 1,65 (2 H, q, J = 7,2 Hz, CH₂), 1,83-2,02 (2 H, m, CH₂), 1,44 (9H, s, Boc), 3,53 (2H, t, J = 6,9 Hz, NCH₂), 3,95 (1H, t, 6,2 Hz, CH), 6,82 (2H, s, maleimide); RMN¹³C (CD₃OD) δ 23,17, 29,03, 31,01, 37,96, 135,26, 172,34, 175,20.

Exemplo 4. ⁵KmPEG-amida-Lys(N^E-maleoil)-COOH (composto 4).

A uma solução de ⁵KmPEGCOONHS (805 mg, 0,16 mmol, 1 eq) em 8 mL de DCM anidro, adicionou-se N^E-maleoil- α -L-lisina (**3**, 82 mg, 0,31 mmol, 2 eq) em 2 mL de DMF seguido por DIEA (109 μ L, 0,62 mmol, 4 eq). A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante a noite, filtrada e evaporada sob vácuo. O resíduo foi primeiramente precipitado com DCM/éter e então recristalizado com CH₃CN/IPA. RMN¹³C (CDCl₃): δ 22,53, 28,02, 31,69, 37,32, 51,18, 58,86, 70,11-71,73 (PEG), 133,84, 169,51, 170,38, 172,41.

Exemplo 5. ⁵KmPEG-amida-Lys(N^E-maleoil)-NHS (composto 5).

⁵KmPEG-Lys(N^E-maleoil)-COOH (**4**) e NHS em DCM a 0°C foram tratados com DCC. A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi evaporado sob vácuo e o resíduo precipitado com DCM/éter e então recristalizado com CH₃CN/IPA.

Exemplo 6. ⁵KmPEG-carbamato-Lys(N^E-maleoil)-COOH (composto 6).

A uma solução de ⁵KmPEGCOONHS (5 g, 0,98 mmol, 1 eq) em 45 mL de DCM anidro, adicionou-se N^E-maleoil- α -L-lisina (**3**, 514 mg, 1,95 mmol, 2 eq) em 5 mL de DMF seguido de DIEA (0,7 mL, 3,92 mmol, 4 eq). A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante a noite, filtrada e evaporada sob vácuo. O resíduo foi primeiramente precipitado com DCM/éter etílico e então recristalizado com CH₃CN/IPA para dar o composto **6**: RMN¹³C δ 22,30, 28,01, 31,89, 37,29, 53,26, 58,89, 64,06, 69,31-71,77 (PEG), 133,87, 155,60, 170,42, 172,82.

Exemplo 7. ⁵KmPEG-carbamato-Lys(N^ε-maleoil)-NHS (composto 7).

A uma solução de ⁵KmPEG-carbamato-Lys(N^ε-maleoil)-COOH (6, 1 g, 0,19 mmol, 1 eq) e NHS (88 mg, 0,76 mmol, 4 eq) em 10 mL de DCM a 0°C adicionou-se DIPC (118 µL, 0,76 mmol, 4 eq). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os solventes foram evaporados sob vácuo e o resíduo foi precipitado com DCM/éter e então recristalizado com CH₃CN/IPA para dar o composto 7: RMN¹³C δ 22,31, 25,90, 28,25, 32,39, 37,44, 52,42, 59,30, 64,92, 69,64-72,18 (PEG), 134,25, 155,59, 167,75, 168,55, 170,91.

Exemplo 8. Composto 8.

A uma solução de 5'extGS (5 mg, 0,85 µmol) em tampão PBS (2,5 mL, pH 7,8) adicionou-se o composto 7 (92 mg, 17 µmol, 20 eq) e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 2 horas. A mistura reacional foi diluída a 10 mL com água, filtrada e vertida numa coluna Poros HQ, de troca iônica forte (10 mm x 1,5 mm, volume de leito ~ 16 mL) que foi pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 (tampão A). A coluna foi lavada com 3-4 volumes de coluna de tampão A para remover o excesso de ligante PEG. Então, o produto foi eluído com um gradiente de 0 a 100 % 1M NaCl em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, tampão B em 10 minutos, seguido por 100 % tampão B por 10 minutos numa razão de fluxo de 10 mL/min. O produto eluído foi dessalgado utilizando-se uma coluna de dessalinização HiPrep (50 mL) e liofilizado para dar o 8 (1 mg oligo equivalente, 40% rendimento).

Exemplo 9. Composto 9.

A uma solução de composto 8 (1 mg oligo equivalente) em tampão PBS (1 mL, pH 7,0) adicionou-se o peptídeo cRGDfC (1 mg, 1,7 µmol) e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 2 horas. A mistura reacional foi diluída a 20 mL com água e vertida numa coluna Poros HQ, de troca iônica forte (10 mm x 1,5 mm, volume de leito ~ 16 mL) que foi pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 (tampão A). A coluna foi lavada com 3-4 volumes de coluna de tampão A para remover o excesso de ligante PEG. Então, o produto foi eluído com um gradiente de 0 a 100 % 1M NaCl em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, tampão B por 10 minutos, seguido por 100 % tampão B por 10 minutos com razão de fluxo de 10 mL/min. O produto eluído foi dessalgado utilizando-se a coluna de

dessalinização HiPrep (50 mL) e liofilizado para dar o composto **9** (0,78 mg oligo equivalente, 78% rendimento).

Exemplo 10. Composto 10.

5 A uma solução de álcool p-amino-benzílico (1 g, 8,12 mmol, 1 eq) em 80 mL de THF anidro adicionou-se DIEA (1,4 mL, 8,12 mmol, 1 eq) e Boc₂O (1,9 mL, 8,12 mmol, 1 eq). A mistura foi aquecida a refluxo durante a noite e então resfriada e evaporada sob vácuo. O resíduo foi dissolvido em EtOAc. A fase orgânica foi lavada com solução 0,1N de HCl, seca sob MgSO₄, filtrada e evaporada sob vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia em
10 coluna em sílica gel (Hex-EtOAc, 1:1, v/v) para dar 1,85 g de produto (rendimento quantitativo): RMN¹H δ 1,49 (9H, s), 2,17 (1H, s), 4,53 (2H, s), 6,83 (1H, s), 7,19 (2H, d, J = 8,5 Hz), 7,28 (2H, d, J = 8,2 Hz); RMN¹³C δ 28,28, 64,54, 80,37, 118,49, 127,59, 135,31, 137,46, 152,72.

15 **Exemplo 11. Composto 11.**

A uma solução a -20°C do composto **10** (220 mg, 0,98 mmol, 1 eq) e DIEA (188 µL, 1,08 mmol, 1,1 eq) em 8 mL de DCM anidro, adicionou-se uma solução de MsCl (84 µL, 1,08 mmol, 1,1 eq) em 2 mL de DCM andro, gota a gota. A mistura foi deixada alcançar a temperatura ambiente e então agitada por 1 hora. A mistura reacional foi lavada com solução
20 de NaHCO₃ saturada, solução de NH₄Cl saturada e salmoura, seca sob MgSO₄, filtrada e evaporada sob vácuo. O composto bruto foi utilizado na etapa seguinte sem purificação adicional.

Exemplo 12. Composto 12.

25 O composto **11** (0,98 mmol, 2 eq) foi dissolvido em 15 mL de DMF anidro e adicionou-se SN38 (192 mg, 0,49 mmol, 1 eq) e K₂CO₃ (68 mg, 0,49 mmol, 1 eq). A mistura reacional foi aquecida a uma temperatura de 60° usando-se um banho de óleo pré-aquecido. Após 2 horas, o HPLC mostrou o desaparecimento total de SN38 e a formação substancial do
30 produto. A mistura reacional foi evaporada sob vácuo e o resíduo re-dissolvido em EtOAc e lavado com água, NH₄Cl saturado e salmoura, seco sob MgSO₄, filtrado e evaporado sob

vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna em sílica gel (CH_2Cl_2 -EtOAc, 1:1, v/v) para dar 140 mg de produto (48% rendimento): RMN^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ 0,88 (3H, t, $J = 7,0$ Hz), 1,27 (3H, t, $J = 7,3$ Hz), 1,47 (9H, s), 1,85-1,88 (2H, m), 3,15-3,17 (2H, m), 5,25 (2H, s), 5,26 (2H, s), 5,42 (2H, s), 6,49 (1H, s), 7,26 (1H, s), 7,41-7,56 (6H, m), 8,05 (1H, d, $J = 9,1$ Hz), 9,39 (1H, s); RMN^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$) δ 7,65, 13,31, 22,09, 27,96, 30,11, 49,31, 65,05, 69,47, 72,17, 78,84, 95,74, 103,39, 117,71, 117,92, 122,35, 127,44, 127,99, 128,43, 129,59, 131,07, 139,07, 143,46, 144,06, 145,92, 149,21, 149,69, 152,37, 156,46, 156,82, 172,11.

10 **Exemplo 13. Composto 13.**

Uma solução 15% (v/v) TFA em DCM foi adicionada ao composto **12** (535 mg) e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 1h ou até que o HPLC tenha mostrado completo desaparecimento do material de partida. Éter etílico (200 mL) foi adicionado e o sólido resultante foi filtrado e lavado com mais éter (307 mg, 58% rendimento).

15 **Exemplo 14. Composto 14.**

Composto **13** (48 mg, 0,1 mmol, 1 eq) e **15** (36 mg, 0,1 mmol, 1 eq) foram tratados com EEDQ (48 mg, 0,2 mmol, 2 eq). A mistura foi agitada no escuro em temperatura ambiente durante a noite. Os solventes foram removidos sob vácuo e o resíduo sólido foi triturado com 10 mL de éter etílico. O sólido foi filtrado e purificado por cromatografia em coluna com sílica gel (CHCl_3 :MeOH, 15:1 a 9:1) para dar o produto desejado (8 mg, 9% rendimento): RMN^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$) δ 7,8, 13,49, 18,11, 18,17, 18,58, 19,13, 19,25, 22,25, 26,51, 26,72, 28,19, 29,59, 30,26, 30,41, 30,50, 49,49, 51,67, 51,80, 52,90, 55,98, 59,26, 59,67, 63,03, 65,21, 69,54, 72,33, 77,91, 78,01, 95,92, 103,63, 118,10, 118,95, 122,52, 127,63, 128,21, 128,58, 131,17, 131,27, 138,53, 143,69, 144,25, 146,10, 149,43, 149,86, 155,15, 155,26, 156,63, 156,97, 158,48, 158,66, 170,39, 171,15, 171,33, 172,15, 172,29.

Exemplo 15. Boc-Val-Cit-OH (Composto 15).

Boc-Val-NHS (10 g, 31,81 mmol, 1 eq) em 80 mL de DME foi adicionado a uma solução de L-citrulina (5,85 g, 33,40 mmol, 1,05 eq) em 20 mL de THF e NaHCO_3 (2,8g, 33,40 mmol, 1,05 eq) em 80 mL de água. A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite.

Ácido cítrico aquoso (200 mL de solução 15% em água) foi adicionado e a mistura foi extraída com 10% IPA/EtOAc (2 x 200 mL). A suspensão foi lavada com água (2 x 200 mL) e o solvente evaporado sob vácuo. O sólido resultante foi triturado com 200 mL de éter etílico e filtrado para dar o produto (6,08 g, 51% rendimento): RMN¹H (CD₃OD) δ 0,92 (3H, d, J = 6,7 Hz), 0,97 (3H, d, J = 6,7 Hz), 1,44 (9H, s), 1,51-2,06 (5H, m), 3,12 (2H, t, J = 6,7 Hz), 3,90 (1H, d, J = 7,0 Hz), 4,37-4,41 (1H, m). RMN¹³C (CD₃OD): δ 18,58, 19,83, 27,58, 28,75, 30,03, 32,09, 40,48, 53,33, 61,38, 80,49, 157,75, 162,05, 174,30, 174,69.

Exemplo 16. Composto 16 (Boc-Val-Cit-PAB).

Boc-Val-Cit (1 g, 2,67 mmol, 1eq) e álcool p-aminobenzílico (362 mg, 2,94 mmol, 1,1 eq) em 2:1 DCM/MeOH (26 mL/13 mL) foram tratados com EEDQ (1,32 g, 5,34 mmol, 2 eq). A mistura foi agitada no escuro em temperatura ambiente durante a noite. Os solventes foram removidos sob vácuo e o sólido resultante triturado com 10 mL de éter etílico. O sólido foi coletado por filtração e lavado com éter etílico para dar o produto (900 mg, 70%): RMN¹H (CD₃OD) δ 0,93 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,97 (3H, d, J = 7,0 Hz), 1,44 (9H, s), 1,49-2,06 (5H, m), 3,07-3,29 (2H, m), 3,91 (1H, d, J = 6,7 Hz), 4,50-4,55 (3H, m), 7,29 (2H, d, J = 8,5 Hz), 7,54 (2H, d, J = 8,5 Hz), 8,22 (1H, d, J = 7,3 Hz); RMN¹³C (CD₃OD) δ 18,64, 19,85, 27,84, 28,75, 30,61, 31,92, 40,28, 54,90, 54,99, 61,73, 64,78, 80,62, 121,09, 128,44, 138,47, 138,55, 158,01, 162,11, 172,00, 174,42, 174,52.

Exemplo 17. Composto 14 (Boc-Val-Cit-PABE-SN38).

A uma suspensão de Boc-Val-Cit-PAB (214 mg, 0,45 mmol, 1 eq) em 3 mL de CH₃CN, adicionou-se DIEA (0,23 mL, 1,35 mmol, 3 eq) seguida de adição, gota a gota, de uma solução de MsCl (0,1 mL, 1,35 mmol, 3 eq) em 1 mL CH₃CN. Depois de 1 hora, TLC mostrou não restar mais material de partida (CHCl₃-MeOH, 5:1, v/v). A mistura reacional foi evaporada sob vácuo e o resíduo resultante foi dissolvido em EtOAc. A fase orgânica foi lavada com NH₄Cl saturado, NaHCO₃ saturado e salmoura; seco sob MgSO₄, filtrado e evaporado sob vácuo. O resíduo bruto foi dissolvido em 5 mL of DMF e adicionou-se SN38 (88 mg, 0,22 mmol, 0,5 eq) e K₂CO₃ (31 mg, 0,22 eq, 0,5 eq) e a mistura foi aquecida a 60°C por 3 horas. A formação de produto foi monitorada e conformada ao produto preparado no Exemplo 14 por HPLC.

Exemplo 18. Composto 17.

Composto **14** em DCM foi tratado com solução 2N HCl em éter. Depois de completada a reação, adicionou-se éter adicional e o sólido resultante foi filtrado e lavado com éter para dar Val-Cit-PABE-SN38. A uma solução de composto **5** em DCM anidro, adicionou-se HCl-Val-Cit-PABE-SN38 em DMF anidro seguido de DIEA. A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi removido sob vácuo e o sólido resultante foi precipitado com DCM/éter e recristalizado com CH₃CN/IPA para dar o produto.

Exemplo 19. Composto 18.

A uma solução de composto **17** (1eq) numa mistura de DCM/DMF, adicionou-se RGDC (2 eq). A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante a noite e então o solvente foi evaporado sob vácuo. O resíduo foi precipitado com DCM/éter etílico e recristalizado com DMF/IPA para dar o produto.

Exemplo 20. Composto 19.

A uma solução de ²⁰kPEGSC de 4 braços (7 g, 0,35 mmol, 1 eq) em 60 mL de DCM anidro, adicionou-se Lys(Boc)-OH (690 mg, 2,8 mmol, 2 eq) em 15 mL de DMF seguido de DIEA (1 mL, 5,6 mmol, 4 eq). A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante a noite, filtrada e evaporada sob vácuo. O resíduo foi primeiramente filtrado com DCM/éter etílico e recristalizado com CH₃CN/IPA para dar o composto **19**: RMN¹³C δ 21,88, 27,97, 29,04, 31,57, 39,60, 44,98, 53,00, 63,44, 68,86-70,37 (PEG), 78,04, 155,26, 172,89.

Exemplo 21. Composto 20.

A uma solução de PEG de 4 braços -Lys(Boc)-OH em 25 mL de DCM anidro, adicionou-se uma solução 4N HCl em dioxano (25 mL). A reação foi agitada em temperatura ambiente por 4 horas e então evaporada sob vacuo. O resíduo foi precipitado pela adição de éter etílico. O sólido foi filtrado e lavado com éter para dar o PEG de 4 braços -Lys-OH (1,77 g): RMN¹³C δ 21,97, 26,54, 31,22, 39,63, 45,11, 53,16, 63,66, 69,88-70,51 (PEG), 78,04, 155,59, 172,78.

Exemplo 22. Composto 21.

Uma solução de BocCys(NPys)-OH (300 mg, 0,80 mmol, 1 eq) e NHS (97 mg, 0,84 mmol, 1,05 eq) em 10 mL de DCM anidro a 0°C foi tratada com DCC (173 mg, 0,84 mmol, 1,05 eq). A mistura foi deixada amornar a temperatura ambiente e agitada durante a noite. O
 5 produto lateral DCU sólido foi filtrado. Ao filtrado, adicionou-se composto **20** (1,7 g, 0,082 mmol, 1 eq) seguido por DIEA (114 µL, 0,66 mmol, 8 eq). A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante a noite e evaporada sob vácuo. O resíduo foi primeiramente precipitado com DCM/éter e, então, recristalizado CH₃CN/IPA para dar o
 10 composto **21** (1,5 g): RMN¹³C δ 22,32, 25,52, 28,27, 28,83, 31,90, 39,03, 42,45, 45,38, 53,41, 53,58, 63,91, 64,37, 69,30-72,38 (PEG), 80,11, 120,98, 133,94, 142,54, 153,34, 155,51, 155,71, 157,28, 169,98, 173,32.

Exemplo 23. Composto 22.

A uma solução de composto **21** (1,5 g, 0,07 mmol, 1 eq) e NHS (125 mg, 1,09 mmol, 16 eq)
 15 em 15 mL de DCM a 0°C, adicionou-se DIPC (168 µL, 1,09 mmol, 16 eq). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os solventes foram evaporados sob vácuo e o resíduo precipitado com DCM/éter e, então, recristalizados com CH₃CN/IPA para dar o produto (1,3 g): RMN¹³C δ 22,05, 25,76, 25,93, 28,68, 28,92, 32,01, 38,89, 42,49, 45,79, 52,40, 53,97, 64,78, 69,57-71,77 (PEG), 80,47, 121,32, 134,29, 142,93, 153,75, 155,71,
 20 157,60, 168,18, 169,14, 169,71, 170,56.

Exemplo 24. Composto 23.

(BocPheLys(Fmoc)-OH). A uma solução de BocPheOSu (1,5g, 4,14mmol, 1 eq) em DCM (10,3 mL) e DMF (10,3 mL), adicionou-se H-Lys(Fmoc)-OH (1,84g, 4,55 mmol, 1,1 eq)
 25 seguido por DIEA (2,9 mL, 16,56 mmol, 4 eq). A mistura reacional resultante foi agitada durante a noite e diluída com acetato de etila. A solução foi lavada com água (30 mL x 2) e salmoura (30 mL x 2). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob MgSO₄ e concentradas *in vacuo* to dar um resíduo amarelo. O resíduo bruto foi então cromatografado sobre sílica gel utilizando CHCl₃-MeOH (3:1, v/v) para dar o produto. MS. [M+1]⁺ 616.

30

Exemplo 25. Composto 24.

Composto **13** (111 mg, 0,22 mmol, 1 eq) e **16** (208 mg, 0,34 mmol, 1,5 eq) foram tratados com EEDQ (167 mg, 0,67 mmol, 3 eq). A mistura foi agitada no escuro em temperatura ambiente durante a noite. Os solventes foram removidos sob vácuo e o resíduo resultante triturado com 10 mL de éter etílico. O sólido foi filtrado e purificado por cromatografia em
5 coluna em sílica gel (CH₂Cl₂-EtOAc, 1:1 a 1:2, v/v) para dar o produto desejado (20 mg, 8% rendimento). MS. [M+1]⁺ 1095.

Exemplo 26. Composto 25.

Composto **24** (8 eq) foi tratado com solução 4N HCl em dioxano. A reação foi agitada em
10 temperatura ambiente por 4 horas. Éter etílico foi adicionado e o sólido foi filtrado. Este sólido foi dissolvido em DMF e adicionado a uma solução de composto **22** (1eq) em DCM. Adicionou-se DIEA (16 eq) a esta mistura e a reação foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi removido sob vácuo e o sólido resultante precipitado com DCM/éter etílico e recristalizado com DMF/IPA para dar o produto.

15

Exemplo 27. Composto 26.

A uma solução de composto **25** em DCM, adicionou-se piperidina. A mistura reacional foi agitada por 4 horas. O solvente foi removido sob vácuo e o sólido resultante precipitado com DCM/éter etílico e recristalizado com DMF/IPA para dar o produto.

20

Exemplo 28. Composto 27.

A uma solução de composto **26** (1eq) numa mistura de DCM/DMF, adicionou-se RGDC (2 eq). A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante a noite e então o solvente foi evaporado sob vácuo. O resíduo foi precipitado com DCM/éter e recristalizado
25 com DMF/IPA para dar o produto.

Exemplo 29. FmocVal-Cit-OH (Composto 28).

Fmoc-Val-NHS (2,5 g, 5,73 mmol, 1 eq) em 15 mL de DME foi adicionado a uma solução de L-citrulina (1,05 g, 6,01 mmol, 1,05 eq) em 8 mL de THF e NaHCO₃ (505 mg, 6,01 mmol,
30 1,05 eq) em 15 mL de água. A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Ácido cítrico aquoso (75 mL de uma solução 15% em água) foi adicionado e a

mistura foi extraída com 10% IPA/EtOAc (2 x 100 mL). As fases orgânicas foram lavadas com água (3 x 100 mL) e o solvente foi evaporado sob vácuo. O sólido resultante foi triturado com 100 mL de éter etílico e filtrado para dar o produto (1,98 g, 70% rendimento):
 5 RMN¹H (DMSO-*d*₆) δ 0,86 (3H, d, J = 6,7 Hz), 0,90 (3H, d, J = 7,0 Hz), 1,40-1,48 (2H, m),
 1,51-1,75 (2H, m), 1,98 (1H, sext, J = 6,8 Hz), 2,95 (2H, q, J = 6,2 Hz), 3,93 (1H, dd, J = 7,3,
 8,8 Hz), 4,14-4,29 (4 H, m), 5,40 (2H, sinal largo), 5,96 (1H, t, J = 5,6 Hz), 7,32 (2H, t, J =
 7,5 Hz), 7,39-7,44 (3H, m), 7,75 (2H, t, J = 6,3 Hz), 7,89 (2H, d, J = 7,3 Hz), 8,19 (1H, d, J =
 7,3 Hz); RMN¹³C (DMSO-*d*₆) δ 18,31, 19,25, 26,75, 28,40, 30,59, 46,68, 51,91, 59,81,
 64,92, 65,65, 119,98, 125,30, 126,94, 127,52, 140,55, 143,61, 143,76, 155,88, 158,58,
 10 171,12, 173,25.

Exemplo 30. FmocVal-Cit-PAB (Composto 29).

Uma solução de composto **28** (1 g, 2,01 mmol, 1eq) e álcool *p*-aminobenzílico (273 mg, 2,21 mmol, 1,1 eq) numa mistura de DCM/MeOH (20 mL/10 mL) foi tratada com EEDQ (996 mg, 4,03 mmol, 2 eq). A mistura foi agitada no escuro em temperatura ambiente durante a
 15 noite. Os solventes foram removidos sob vácuo e o sólido resultante foi triturado com 10 mL de éter etílico. O sólido foi coletado por filtração e lavado com éter etílico para dar o produto (925 mg, 76% rendimento): RMN¹H (DMSO-*d*₆) δ 0,87 (6H, d, t = 7,5 Hz), 1,36-1,47 (2H, m), 1,51-1,75 (2H, m), 1,99 (1H, sext, J = 6,7 Hz), 2,90-3,04 (3H, m), 3,93 (1H, dd, J = 7,3, 8,8 Hz), 4,23-4,38 (4 H, m), 4,43 (2H, d, J = 5,3 Hz), 5,13 (1H, t, J = 5,6 Hz), 5,43 (2H, sinal largo), 5,99 (1H, t, J = 5,6 Hz), 7,23 (2H, d, J = 8,5 Hz), 7,32 (2H, t, J = 7,3 Hz), 7,39-7,48 (3H, m), 7,54 (2H, d, J = 8,5 Hz), 7,74 (2H, t, J = 6,7 Hz), 7,89 (2H, d, J = 7,6 Hz), 8,12 (1H, d, J = 7,3 Hz); RMN¹³C (DMSO-*d*₆) δ 18,34, 19,28, 26,84, 29,56, 30,47, 46,67, 53,05, 60,05, 62,55, 65,65, 118,71, 119,98, 125,23, 126,79, 126,94, 127,51, 137,27, 137,36, 140,55,
 20 143,60, 143,73, 155,93, 158,69, 170,17, 171,06.
 25

Exemplo 31. Val-Cit-PAB (Composto 30).

A uma solução de composto **29** (622 mg, 1,03 mmol) em 10 mL de DMF anidro foi adicionada piperidina (2 mL). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite
 30 e então os solventes evaporados sob vácuo. O resíduo foi triturado com DCM e o sólido resultante foi filtrado e lavado com DCM para dar produto (283 mg, 72% rendimento):

RMN¹H (DMSO-*d*₆) δ 0,79 (3H, d, J = 6,7 Hz), 0,89 (3H, d, J = 6,7 Hz), 1,38-1,42 (2H, m), 1,52-1,68 (2H, m), 1,94 (1H, sext, J = 6,3 Hz), 2,89-3,01 (2H, m), 3,05 (1H, d, J = 4,7 Hz), 4,46 (2H, s), 5,09 (1H, sinal largo), 5,40 (2H, s), 5,98 (1H, t, J = 5,3 Hz), 7,23 (2H, d, J = 8,2 Hz), 7,54 (2H, d, J = 8,5 Hz), 8,14 (1H, sinal largo), 10,03 (1H, s); RMN¹³C (DMSO-*d*₆) δ 16,80, 19,33, 26,53, 29,95, 31,10, 52,31, 59,33, 62,35, 118,61, 126,59, 137,06, 137,14, 158,44, 170,06, 173,69.

Exemplo 32. Composto 31.

A uma solução de composto **22** (1,3 g, 0,06 mmol, 1 eq) em 15 mL de DCM anidro e 3 mL de DMF anidro, adicionou-se o composto **30** (175 mg, 0,46 mmol, 8 eq). A mistura reacional foi agitada durante a noite em temperatura ambiente e o solvente foi evaporado sob vácuo. O resíduo foi precipitado com DCM/éter e recristalizado com CH₃CN/IPA para dar o produto (1,1 g): RMN¹³C (CDCl₃/CD₃OD) δ 18,48, 19,46, 22,85, 26,74, 28,54, 28,94, 29,50, 30,47, 31,81, 39,21, 42,04, 45,79, 53,51, 54,06, 55,32, 59,67, 64,32, 65,04, 69,54-70,99 (PEG), 80,70, 120,23, 121,44, 127,64, 134,31, 137,16, 142,94, 153,86, 155,86, 156,85, 160,44, 170,45, 171,02, 171,87, 173,19.

Exemplo 33. Composto 32.

A uma solução de composto **31** (1 eq) numa mistura de DCM/DMF (4/1, v/v), adicionou-se DSC (16 eq) e a mistura foi resfriada a 0°C. Então, piridina (16 eq) foi adicionada e a mistura gradualmente amornada a temperatura ambiente e agitada durante a noite. O solvente foi evaporado sob vácuo e o resíduo foi precipitado com DCM/éter etílico e recristalizado com CH₃CN/IPA para dar o produto.

Exemplo 34. Composto 33.

A uma solução de composto **32** adicionou-se doxorrubicina. A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi evaporado sob vácuo e o resíduo foi precipitado com DCM/éter etílico e recristalizado com DMF/IPA para dar o produto.

Exemplo 35. Composto 34.

A uma solução de composto **33** (1eq) numa mistura de DCM/DMF adicionou-se RGDC (2 eq). A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi evaporado sob vácuo e o resíduo foi precipitado com DCM/éter etílico e recristalizado com DMF/IPA para dar o produto.

5

Exemplo 36. Composto 35.

A uma solução de composto **19** (6,14 g, 0,307 mmol, 1 eq) e NHS (283 mg, 2,456 mmol, 8 eq) em 31 mL de DCM anidro a 0°C, adicionou-se DCC (507 mg, 2,456 mmol, 2 eq). A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante a noite, filtrada sob uma placa de Celite® e evaporada sob vácuo. O resíduo foi precipitado com DCM/éter etílico e recristalizado com CH₃CN/IPA para dar o produto (5,69 g, 86%): RMN¹³C δ 21,59, 25,21, 28,11, 29,03, 31,42, 39,36, 45,13, 51,80, 64,07, 68,90-70,53 (PEG), 155,15, 155,58, 168,17, 168,54.

15 **Exemplo 37. Composto 36**

A uma solução de composto **35** (5,0g, 0,232 mmol, 1 eq) em 23 mL de DCM anidro e DMF anidro, adicionou-se HCl.NH₂Cys(NPys)-OH (0,77g, 2,78 mmol, 12 eq) seguido por DIEA (0,65 mL, 3,71 mmol, 16 eq). A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante a noite e evaporada sob vácuo depois de filtrada sob uma placa de Celite®. O resíduo foi precipitado com DCM/éter etílico e recristalizado com CH₃CN/IPA para dar o produto (4,88 g, 95% rendimento): RMN¹³C δ 22,17, 28,22, 29,27, 31,85, 39,92, 45,22, 51,85, 54,49, 63,98, 69,06-70,62 (PEG), 78,56, 120,87, 132,88, 142,27, 153,44, 155,67, 156,47, 162,14, 170,74, 171,20.

25 **Exemplo 38. Composto 37.**

A uma solução de composto **36** (4,38g, 0,197 mmol, 1 eq) em DCM (44 mL), adicionou-se 8.8 mL de TFA e a mistura reacional foi deixada agitando durante a noite em temperatura ambiente. Depois de 20 horas a mistura reacional foi evaporada sob vácuo e o resíduo foi precipitado com DCM/éter etílico e recristalizado com CH₃CN/IPA para dar o produto (2,1 g, 49%): RMN¹³C δ 21,47, 26,41, 31,64, 39,47, 45,25, 52,32, 54,11, 63,75, 69,12-70,65 (PEG), 120,85, 133,46, 142,25, 153,67, 155,64, 156,39, 171,53, 171,79.

30

Exemplo 39. Composto 38.

A uma solução de ácido fólico (124mg, 0,28mmol, 1eq) em 3,1 mL de DMSO em temperatura ambiente, adicionou-se NHS (71mg, 0,616 mmol, 2,2 eq) seguido de adição de
5 DCC (64 mg, 0,308 mmol, 1,1 eq) e 63 μ L de trietilamina. A mistura reacional foi agitada durante a noite no escuro e filtrada sob uma placa de Celite[®] para dar uma solução amarela de FA-NHS que foi utilizada para a próxima etapa de acoplamento com o ligante. A uma
- solução de H₂N-Lys(PEG de 4 braços)CysNPys (**37**, 381 mg, 0,0175mmol, 1eq) em 4 mL de DCM anidro e DMF anidro, adicionou-se uma solução de DMSO de FA-NHS (preparado
- como mostrado acima) seguido por DIEA (49 μ L, 0,28 mmol, 16 eq). A mistura reacional foi
10 deixada agitando durante a noite no escuro em temperatura ambiente. Ela foi então dialisada por 4 dias com água destilada. A solução amarela foi então liofilizada para dar 197 mg do produto final.

15 Exemplo 40. Composto 39.

A uma solução de C6-tio-LNA-survivina (OligoSH) em tampão fosfato pH 6,5, adicionou-se o **38** e a solução foi agitada por 1 hora em temperatura ambiente. O progresso da reação foi verificado por HPLC de troca aniônica. A mistura reacional foi filtrada com filtro 0,2 micra e vertido numa coluna de troca aniônica Poros. O produto foi eluido com um gradiente usando
20 sistema de tampão 20 mM Tris. HCl 2M NaCl em pH 7,0. O produto foi dessalgado e liofilizado.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

5 <110> ENZON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> PRO DROGAS POLIMERICAS DIRECIONADAS CONTENDO LIGANTES MULTIFUNCIONAIS

10 <130> 213.1263-PCT

<140>

<141>

15 <150> 60/884.943

<151> 15 -09-2006

<160> 7

20 <170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: Peptídeo sintético

30 <400> 1

Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

35 <210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

40 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 2

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

45

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

50 <213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição de Sequência artificial: Oligonucleotídeo sintético

5 <220>
<221> aspecto-miscelânea
<222> (1) (16)
<223> Tioesqueleto

10 <220>
<221> base modificada
<222> (1)
<223> Citosina metilada

15 <220>
<221> aspecto-miscelânea
<222> (1)
<223> LNA

20 <220>
<221> aspecto-miscelânea
<222> (2)
<223> LNA

25 <220>
<221> base modificada
<222> (3)
<223> Citosina metilada

30 <220>
<221> aspecto-miscelânea
<222> (3)
<223> LNA

35 <220>
<221> aspecto-miscelânea
<222> (4)
<223> LNA

40 <220>
<221> base modificada
<222> (13)
<223> Citosina metilada

45 <220>
<221> aspecto-miscelânea
<222> (13)
<223> LNA

50 <220>
<221> aspecto-miscelânea
<222> (14)
<223> LNA

<220>
 <221> aspecto-miscelânea
 <222> (15)
 5 <223> LNA

 <400> 3
 ctcaatccat ggcagc 16

 10 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 15 <220>
 <223> Descrição de Combined DNA/RNA Molecule: Oligonucleotídeo
 sintético
 20 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: Oligonucleotídeo sintético

 <220>
 <221> aspecto-miscelânea
 25 <222> (1) (19)
 <223> RNA

 <400> 4
 30 gcaugcggcc ucuguuugat t 21

 <210> 5
 <211> 21
 35 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição de molécula combinada DNA/RNA:
 40 Oligonucleotídeo sintético

 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: Oligonucleotídeo sintético

 45 <220>
 <221> aspecto-miscelânea
 <222> (1) (19)
 <223> RNA

 50 <400> 5
 ucaaacagag gccgcaugct t 21

<210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 5 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: Oligonucleotídeo sintético
 10 <220>
 <221> aspecto-miscelânea
 <222> (1)..(18)
 <223> Tioesqueleto
 15 <400> 6
 tctcccagcg tgcgccat 18

 <210> 7
 20 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 25 <223> Descrição de Sequência artificial: Oligonucleotídeo sintético

 <220>
 <221> aspecto-miscelânea
 <222> (1) (16)
 30 <223> Tioesqueleto

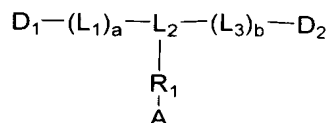
 <220>
 <221> aspecto-miscelânea
 <222> (1) (3)
 35 <223> LNA

 <220>
 <221> aspecto-miscelânea
 <222> (13) (15)
 40 <223> LNA

 <400> 7
 tggcaagcat cctgta 16

REIVINDICAÇÕES

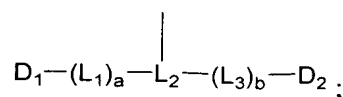
1. Composto, **caracterizado** pelo fato de ser de Fórmula (I)



em que:

- 5 R_1 é um polímero hidrossolúvel substancialmente não-antigênico;

A é um grupo de proteção ou



cada D_1 é independentemente selecionado do grupo consistindo de porções direcionadoras, grupos funcionais e grupos de saída;

- 10 cada D_2 é independentemente selecionado do grupo consistindo de porções biologicamente ativas, grupos funcionais e grupos de saída;

cada L_1 é independentemente um ligante permanente ou um ligante lábil selecionado;

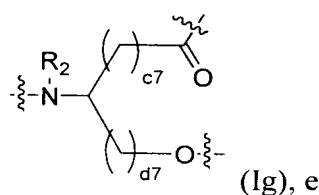
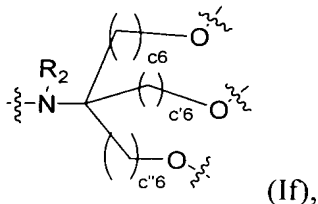
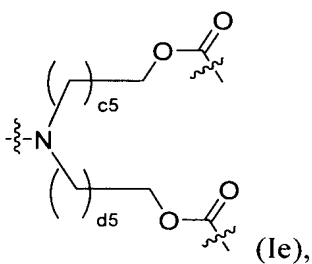
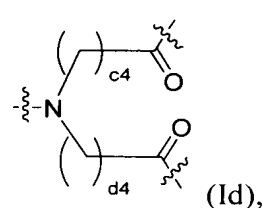
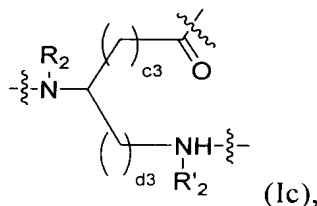
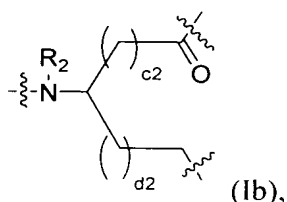
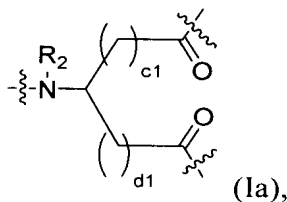
L_2 é um ligante multifuncional;

cada L_3 é independentemente um ligante permanente ou um ligante lábil selecionado,

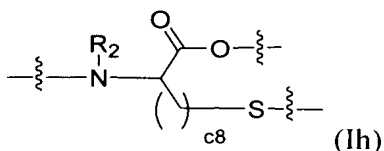
15 e

(a) e (b) são independentemente zero ou um número inteiro positivo.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que L_2 é selecionado do grupo consistindo de:



20



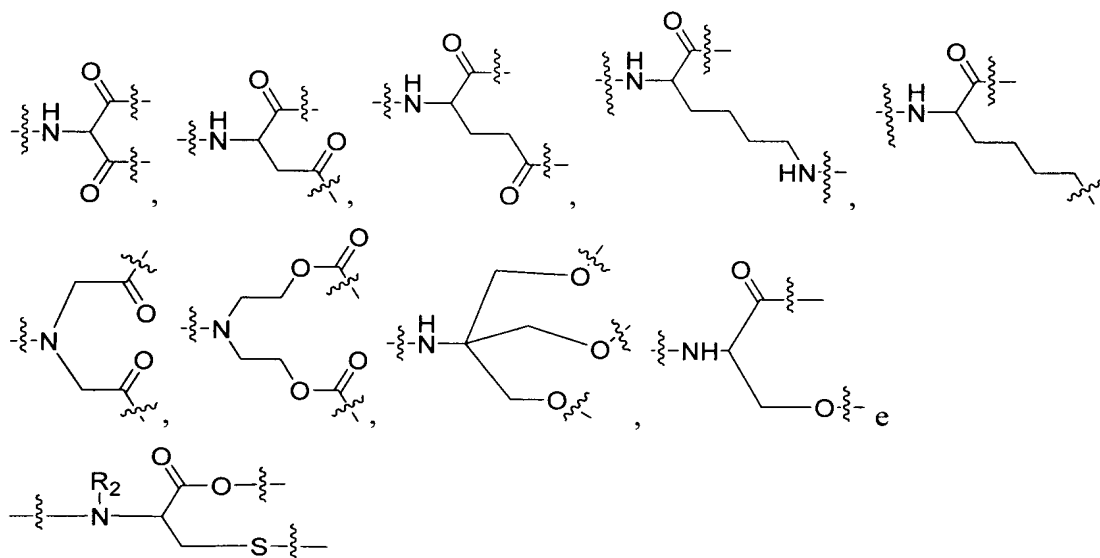
em que

- R_2 e R'_2 são independentemente selecionados do grupo consistindo de hidrogênio, C_{1-6} alquila, C_{2-6} alquenila, C_{2-6} alquinila, C_{3-19} alquila ramificada, C_{3-8} cicloalquila, C_{1-6} alquila substituída, C_{2-6} alquenila substituída, C_{2-6} alquinila substituída, C_{3-8} cicloalquila substituída, arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, C_{1-6} heteroalquila, C_{1-6} heteroalquila substituída, C_{1-6} alcóxi, arilóxi, C_{1-6} heteroalcóxi, heteroarilóxi, C_{2-6} alcanoil, arilacarbonil, C_{2-6} alcoxicarbonil, arilaoxicarbonil, C_{2-6} alcanoilóxi, arilacarbonilóxi, C_{2-6} alcanoil substituída, arilcarbonil substituída, C_{2-6} alcanoilóxi substituída, ariloxicarbonil substituída, C_{2-6} alcanoilóxi substituída e arilcarbonilóxi substituída;

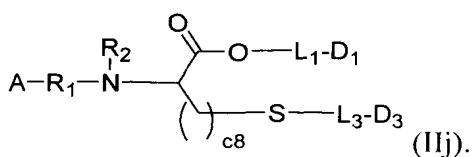
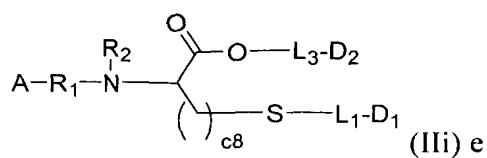
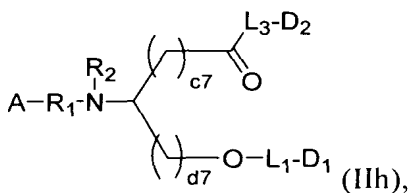
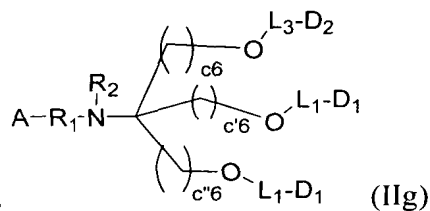
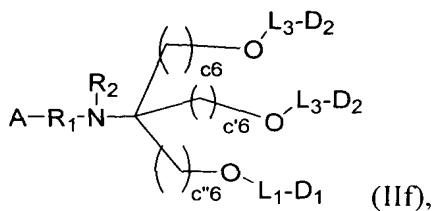
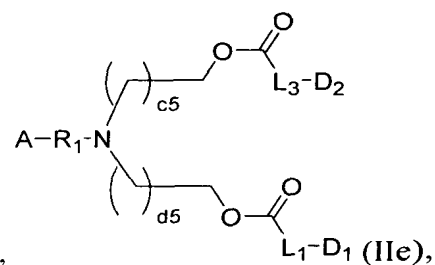
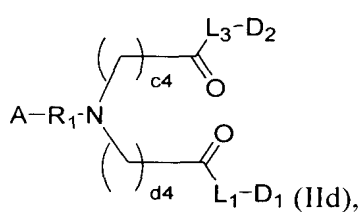
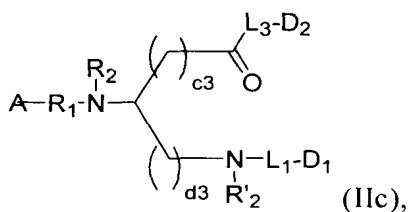
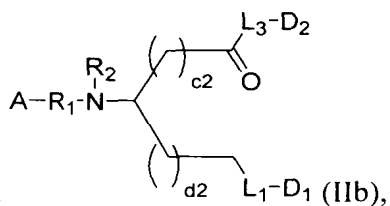
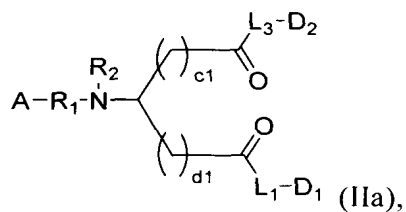
(c1), (c2), (c3), (c4), (c5), (c6), (c'6), (c'6), (c7) e (c8) são independentemente zero ou um número inteiro positivo; e

(d1), (d2), (d3), (d4), (d5) e (d7) são independentemente zero ou um número inteiro positivo.

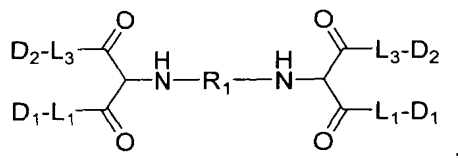
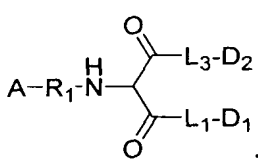
3. Composto de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que L_2 é selecionado do grupo consistindo de:

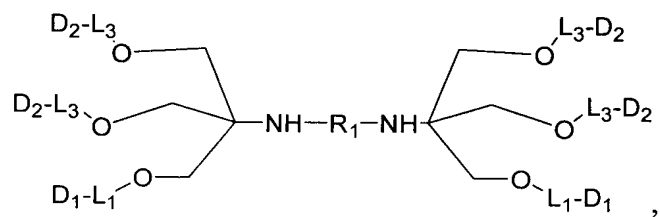


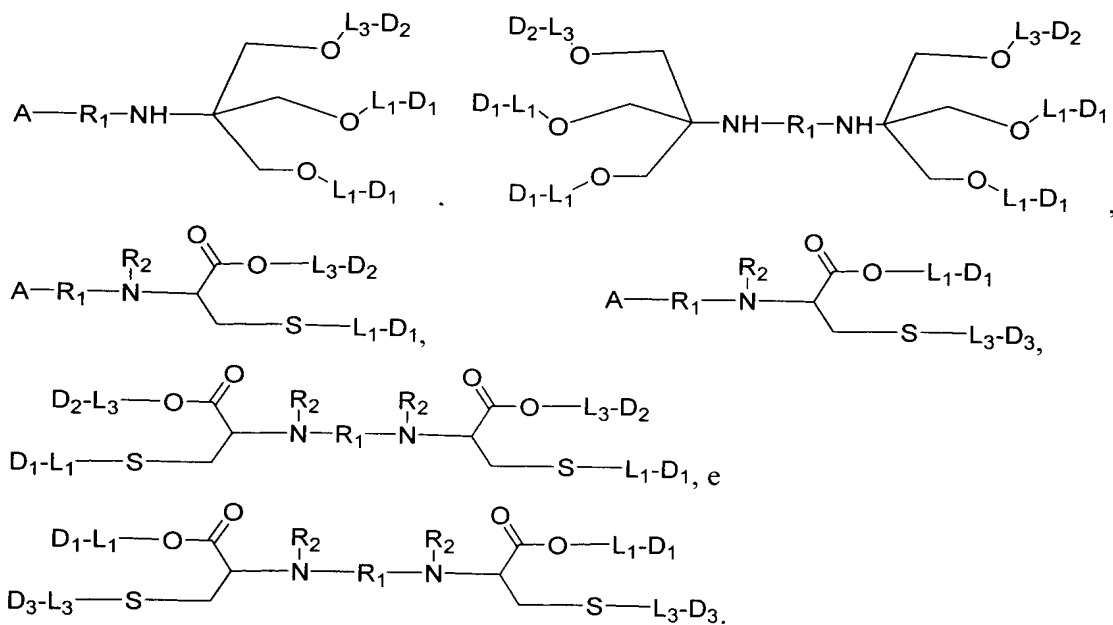
4. Composto de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo de:



5. Composto de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo de:







6. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a porção biologicamente ativa é selecionada do grupo consistindo de porções contendo -NH₂, -OH e -SH.

7. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a porção biologicamente ativa é selecionada do grupo consistindo de compostos farmacologicamente ativos, enzimas, proteínas, oligonucleotídeos, anticorpos, anticorpos monoclonais, anticorpos de cadeia simples e peptídeos.

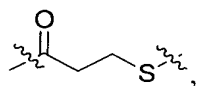
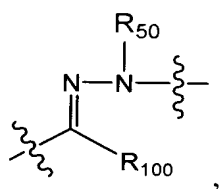
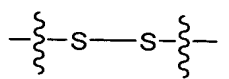
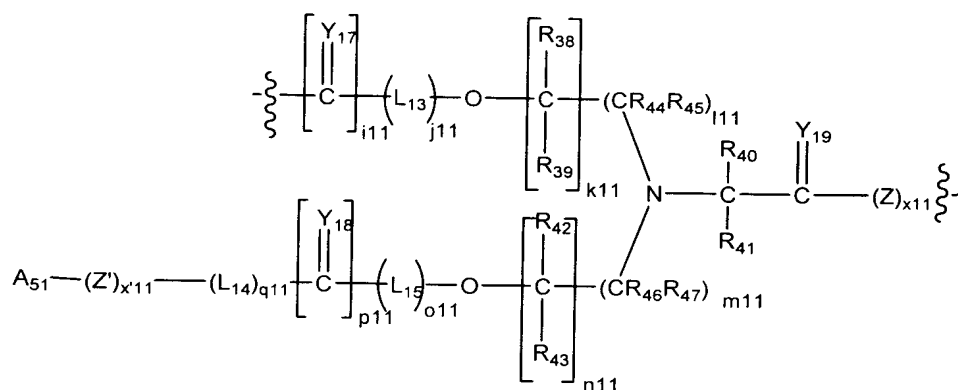
8. Composto de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que os compostos farmacologicamente ativos são selecionados do grupo consistindo de inibidores de DNA topoisomerase, drogas inibidoras de microtubulos, agentes danificadores de DNA, antimetabolitos, análogos de nucleosídeo e drogas anti-câncer.

9. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a porção biologicamente ativa é um oligonucleotídeo.

10. Composto de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o oligonucleotídeo é selecionado do grupo consistindo de oligonucleotídeos antisense, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), RNA de pequena interferência (siRNA), microRNA (miRNA), aptameros, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), e oligonucleotídeos morfolino fosfodiamidato (PMO).

- 1





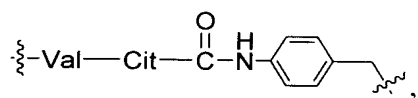
5

-Val-Cit-,

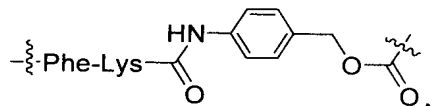
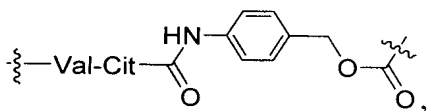
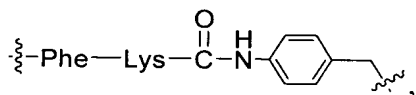
-Gly-Phe-Leu-Gly-,

-Ala-Leu-Ala-Leu-

-Phe-Lys-,



10

-Val-Cit-C(=O)-CH₂OCH₂-C(=O)-,-Val-Cit-C(=O)-CH₂SCH₂-C(=O)-, e

-NHCH(CH₃)-C(=O)-NH(CH₂)₆-C(CH₃)₂-C(=O)-,

em que

Y₁₁₋₁₉ são independentemente O, S ou NR₄₈;

R₃₁₋₄₈, R₅₀, R₁₀₀ e A₅₁ são independentemente selecionados do grupo consistindo de
 5 hidrogênio, C₁₋₆ alquilas, C₃₋₁₂ alquilas ramificadas, C₃₋₈ cicloalquilas, C₁₋₆ alquilas substituídas, C₃₋₈ cicloalquilas substituídas, arilas, arilas substituídas, aralquilas, C₁₋₆ heteroalquilas, C₁₋₆ heteroalquilas substituídas, C₁₋₆ alcóxi, C₁₋₆ alquilocarbonil, fenóxi e C₁₋₆ heteroalcóxi;

Ar é uma porção arila ou heteroarila;

10 L₁₁₋₁₅ são independentemente espaçadores bifuncionais selecionados;

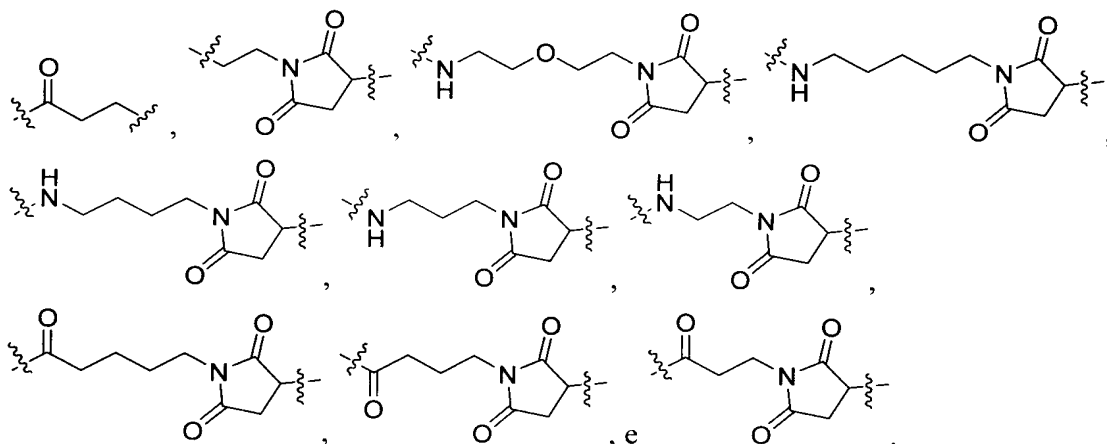
Z e Z' são independentemente selecionados do grupo consistindo de porções ativamente transportadas para uma célula alvo, porções hidrofóbicas, porções ligantes bifuncionais e combinações das mesmas;

15 (c11), (h11), (k11), (l11), (m11) e (n11) são independentemente números inteiros positivos selecionados;

(a11), (e11), (g11), (j11), (o11) e (q11) são independentemente tanto zero ou um número inteiro positivo; e

(b11), (x11), (x'12), (f11), (i11) e (p11) são independentemente zero ou um.

16. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os
 20 ligantes permanentes são independentemente selecionados do grupo consistindo de:

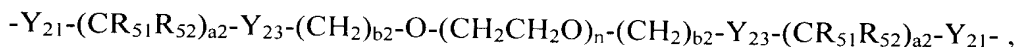
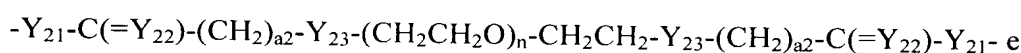
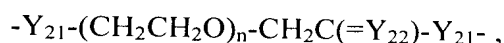
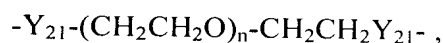


17. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que L_1 e L_3 são independentemente selecionados do grupo consistindo de um aminoácido, um derivado de aminoácido e um peptídeo.

18. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que R_1 compreende um óxido de polialquileno linear, ramificado terminalmente ou multi-braços.

19. Composto de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que o óxido de polialquileno é selecionado do grupo consistindo de polietileno glicol e polipropileno glicol.

20. Composto de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que o óxido de polialquileno é selecionado do grupo consistindo de



em que:

Y_{21} e Y_{23} são independentemente O, S, SO, SO_2 , NR_{53} ou uma ligação;

Y_{22} é O, S, ou NR_{53} ;

R_{51-53} são independentemente selecionados do grupo para R_2 ;

(a2) e (b2) são independentemente zero ou um número inteiro positivo; e

(n) é um número inteiro de cerca de 10 a cerca de 2300.

21. Composto de acordo com a reivindicação 18 **caracterizado** pelo fato de que o óxido de polialquileno é um polietileno glicol Fórmula, $-O-(CH_2CH_2O)_n-$

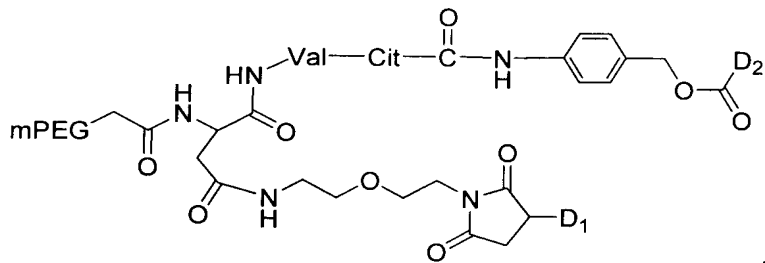
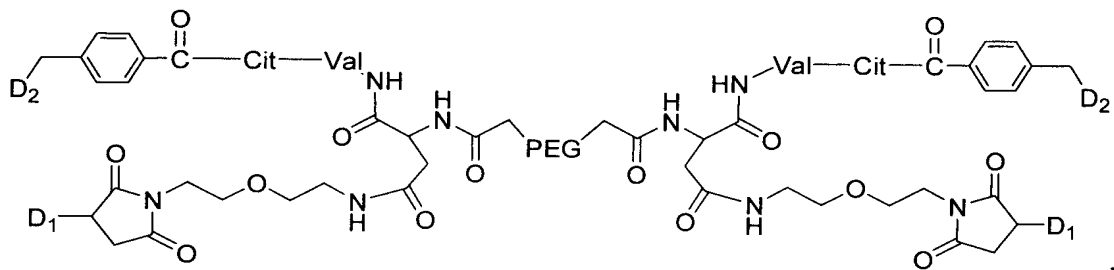
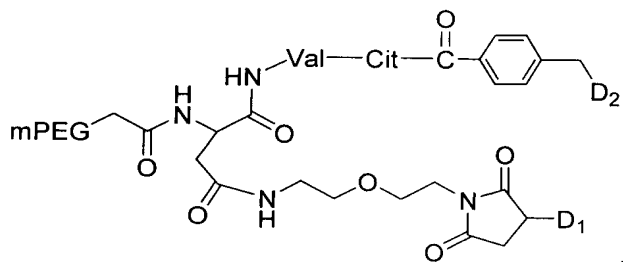
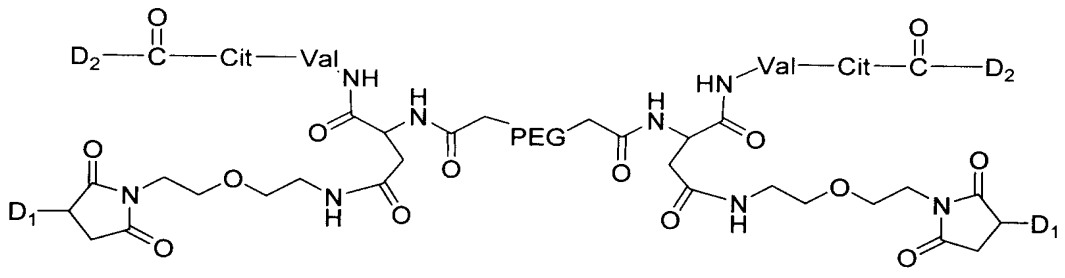
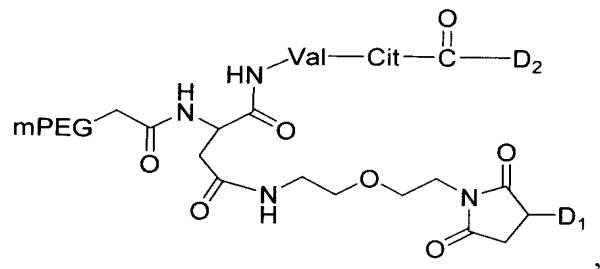
em que (n) é um número inteiro de cerca de 10 a cerca de 2,300.

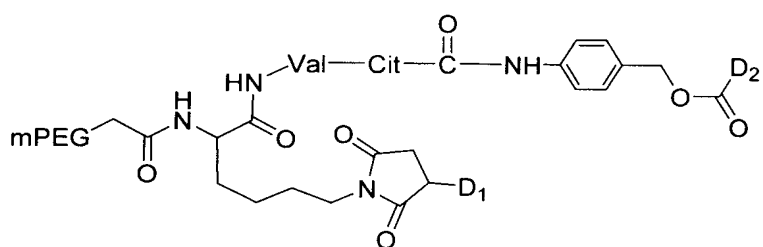
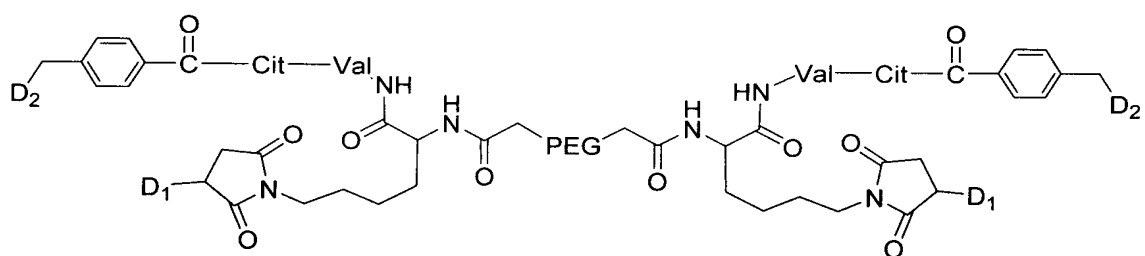
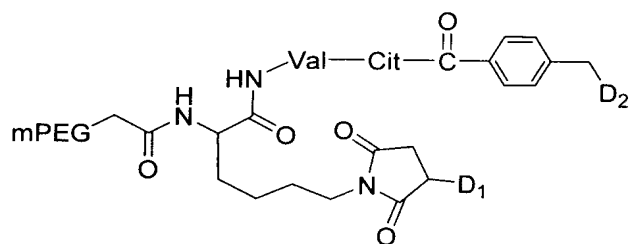
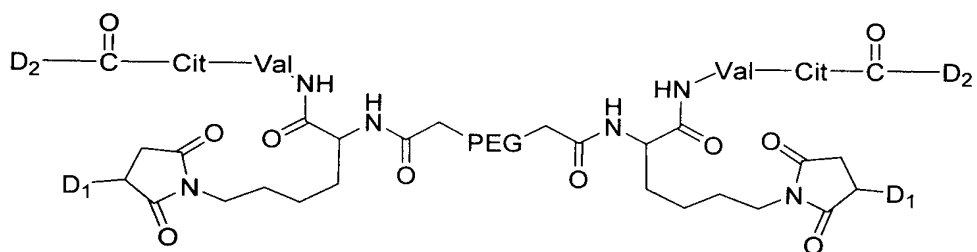
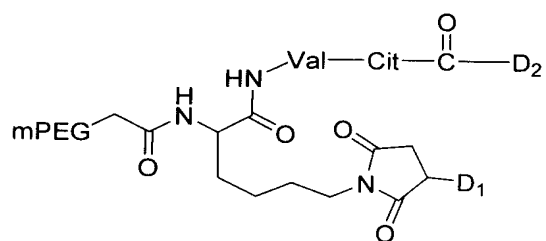
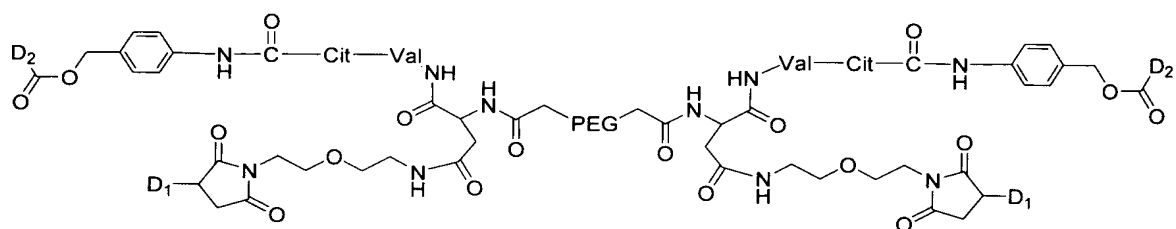
22. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que R_1 possui um peso molecular médio de cerca de 2.000 a cerca de 100.000 daltons.

23. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que R_1 possui um peso molecular médio de cerca de 5.000 a cerca de 60.000 daltons.

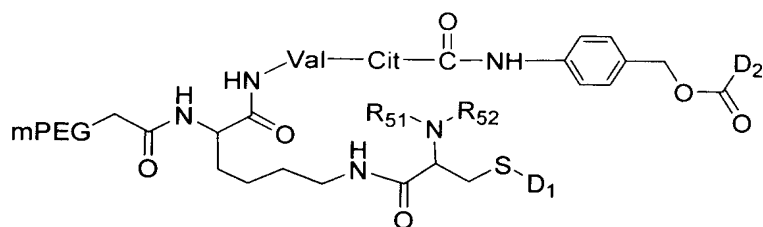
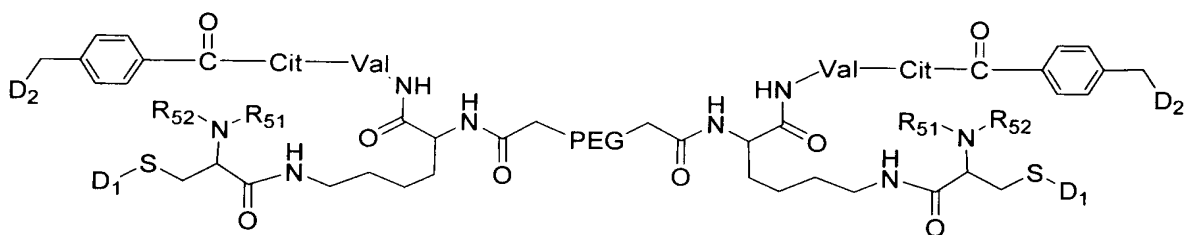
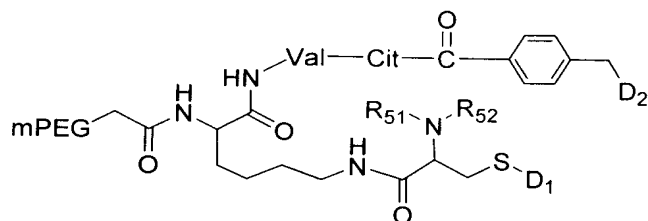
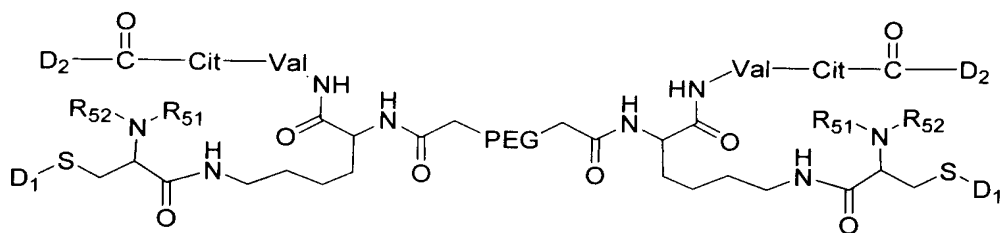
24. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que R_1 possui um peso molecular médio de cerca de 5.000 a cerca de 25.000 daltons ou de cerca de 20.000 a cerca de 45.000 daltons.

25. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo de:

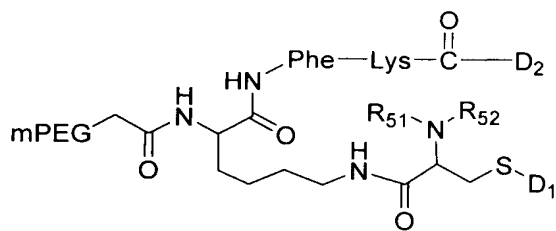
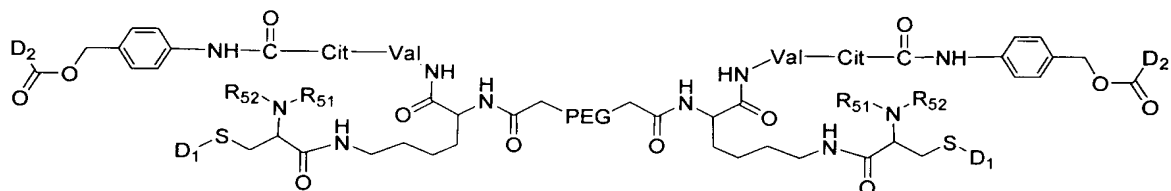


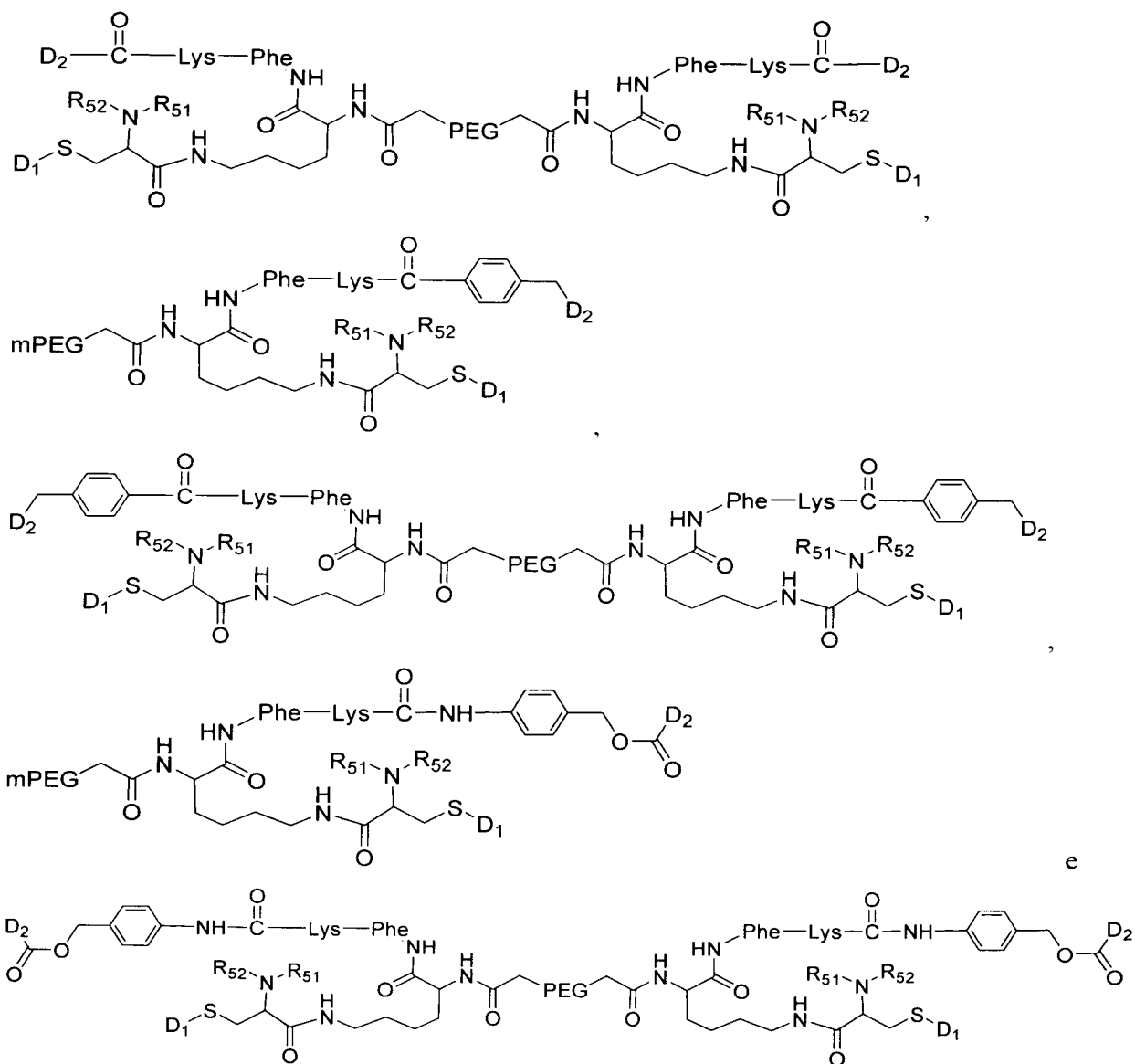






5





em que

mPEG tem Fórmula: $CH_3-O(CH_2CH_2O)_n-$;

PEG tem Fórmula $-O(CH_2CH_2O)_n-$;

10 (n) é um número inteiro positivo de cerca de 10 a cerca de 2.300;

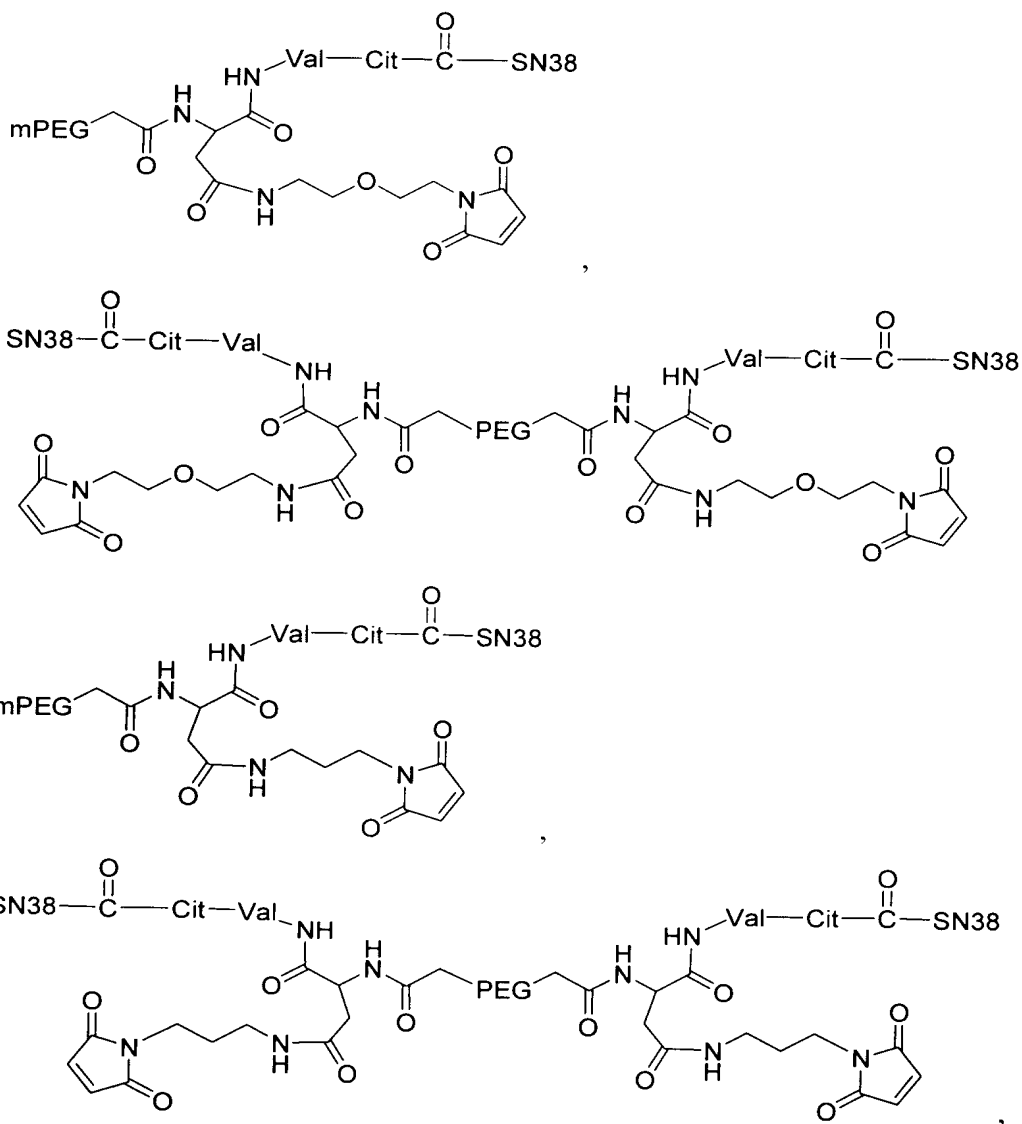
R_{51} e R_{52} são independentemente selecionados do grupo consistindo de hidrogênio, C_{1-6} alquilas, C_{3-12} alquilas ramificadas, C_{3-8} cicloalquilas, C_{1-6} alquilas substituídas, C_{3-8} cicloalquilas substituídas, arilas, arilas substituídas, aralquilas, C_{1-6} heteroalquilas, C_{1-6}

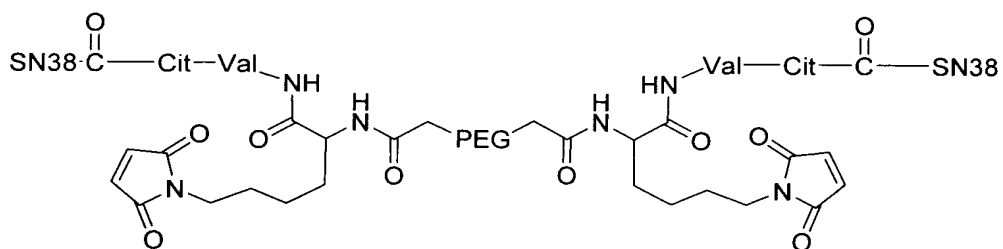
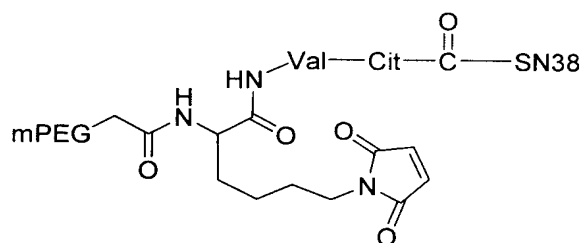
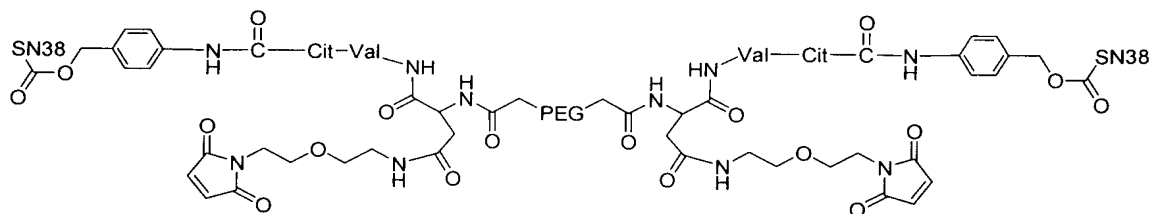
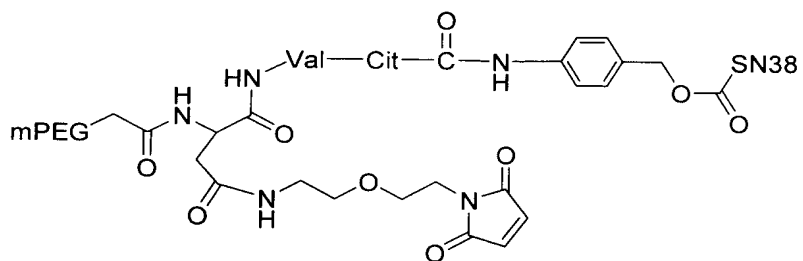
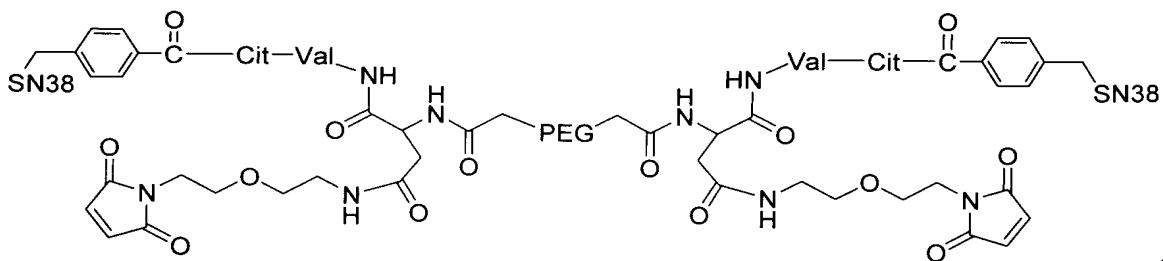
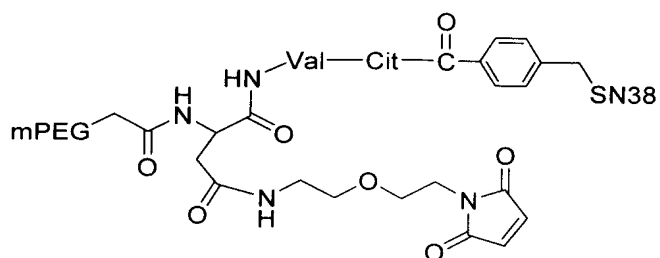
heteroalquilas substituídas, C₁₋₆ alcóxi, C₁₋₆ alquiloxicarbonil, ariloxicarbonil, fenóxi e C₁₋₆ heteroalcóxi;

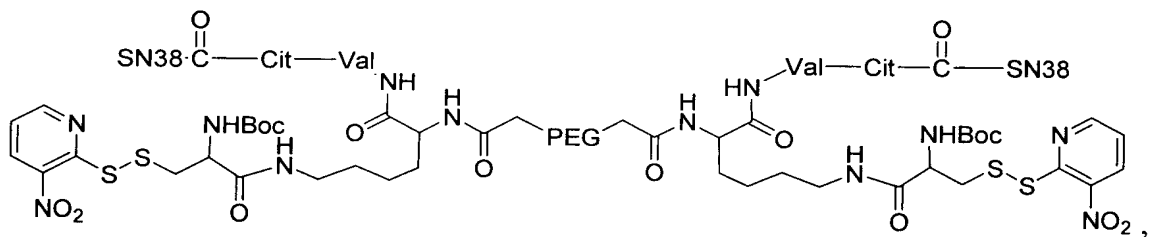
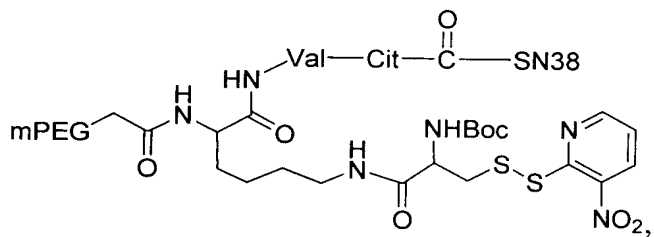
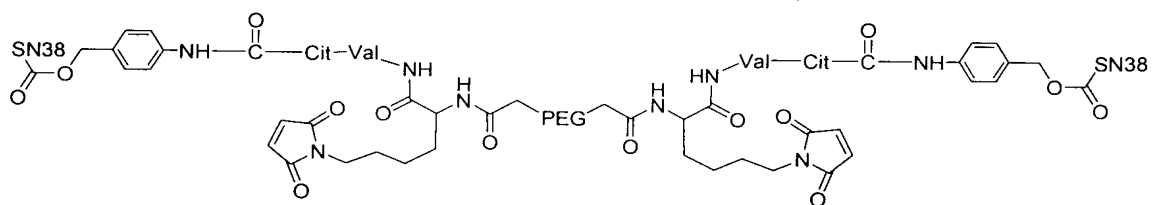
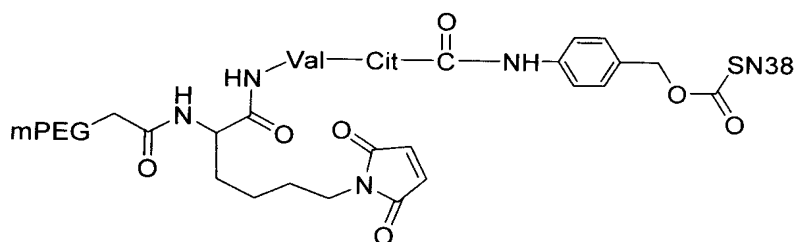
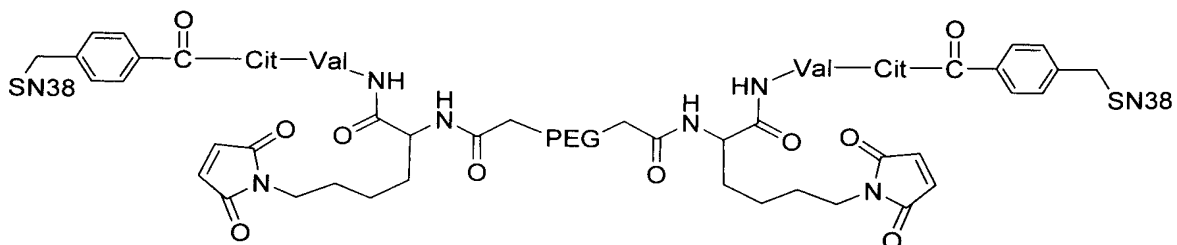
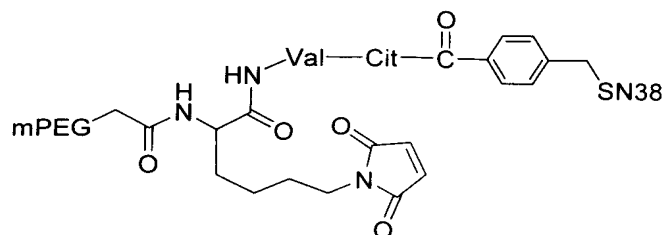
D₁ é uma porção direcionadora, um grupo funcional ou um grupo de saída; e

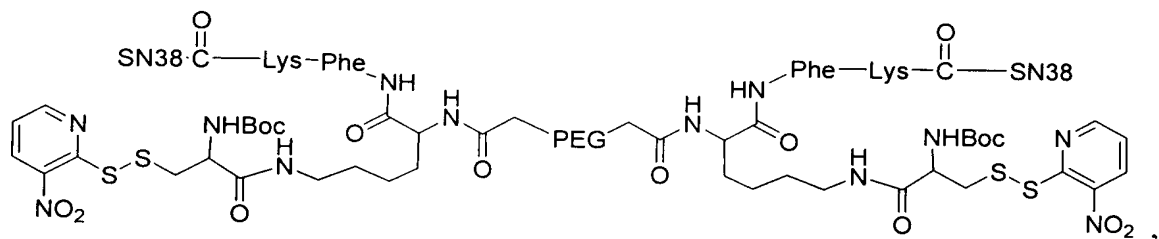
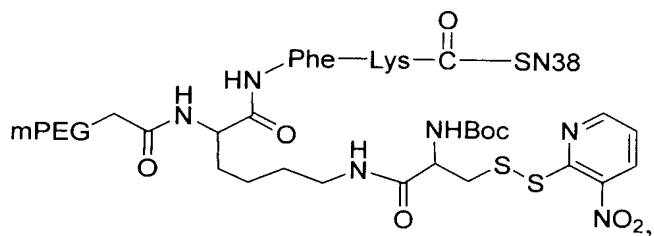
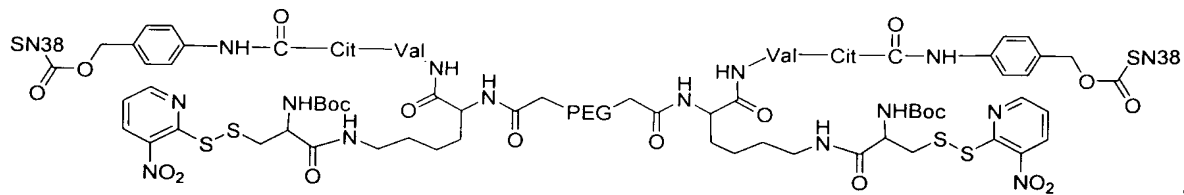
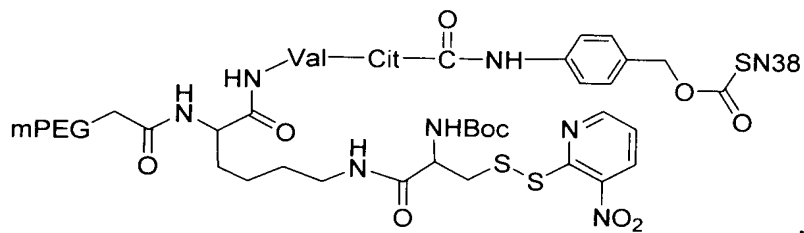
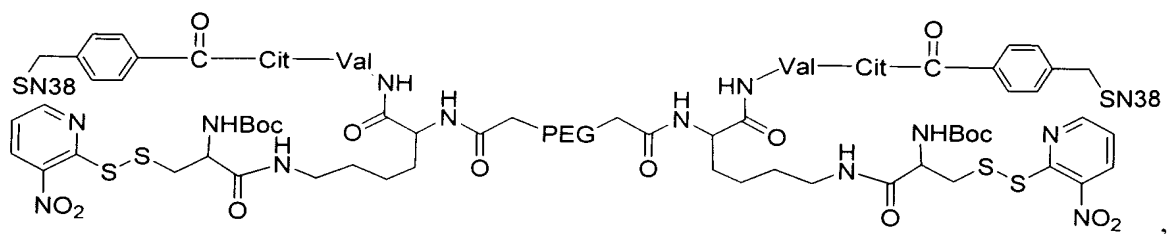
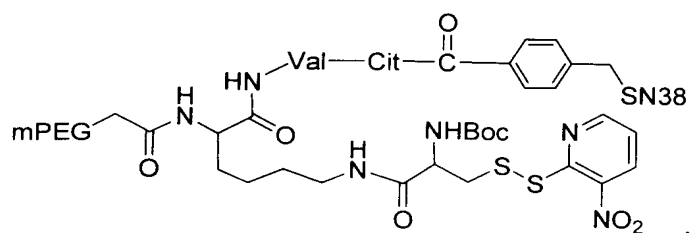
D₂ é uma porção biologicamente ativa, um grupo funcional ou um grupo de saída.

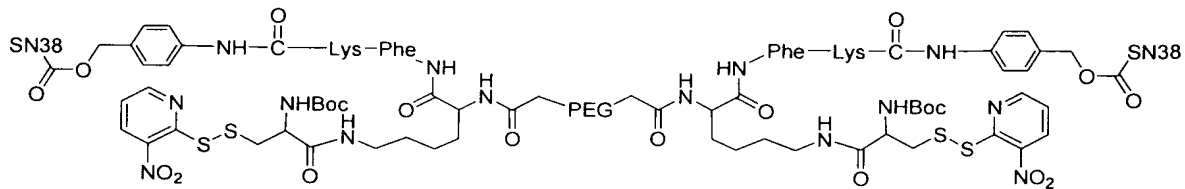
- 5 25. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo de:



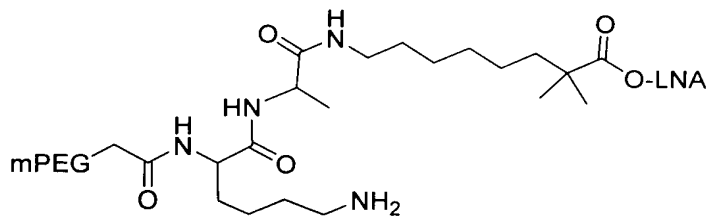
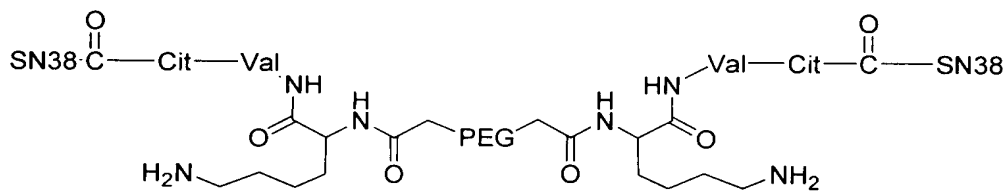


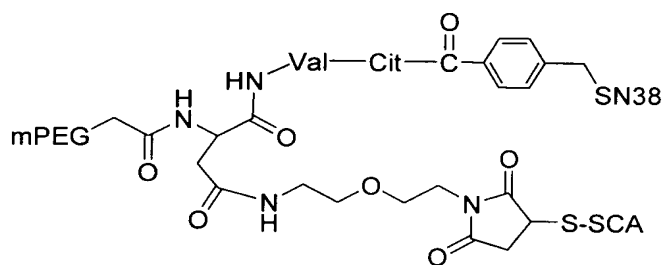
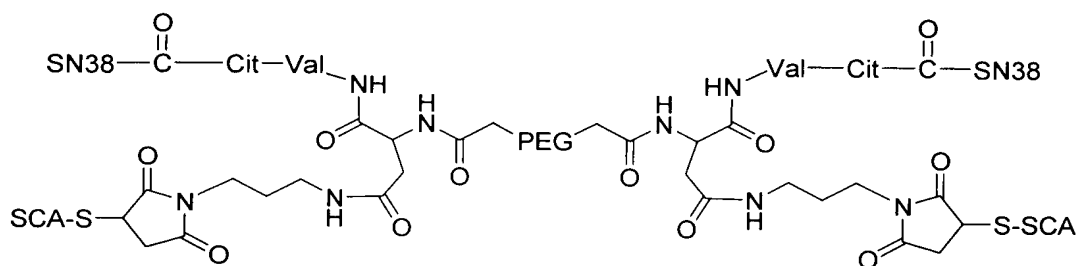
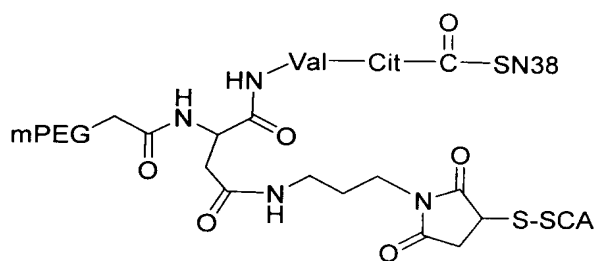
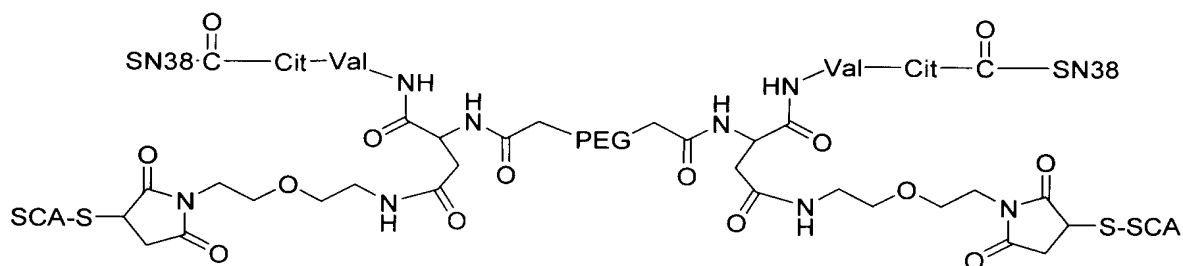
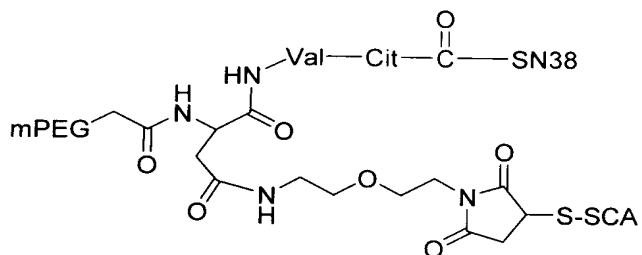
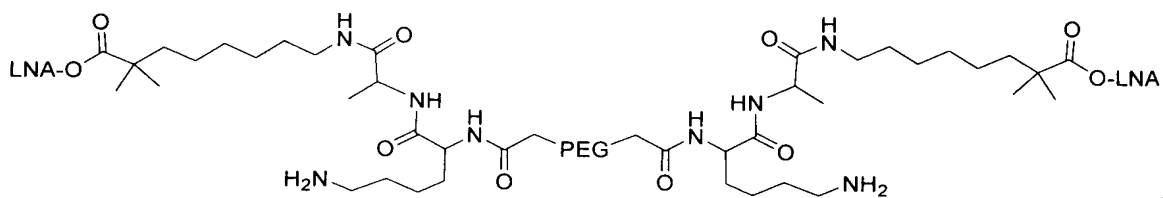


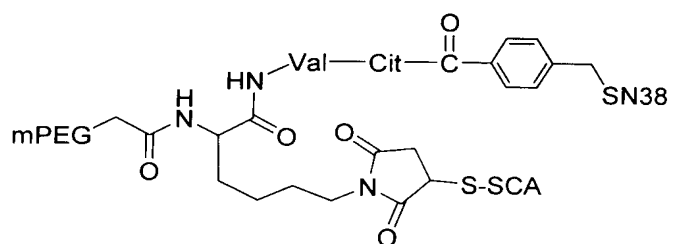
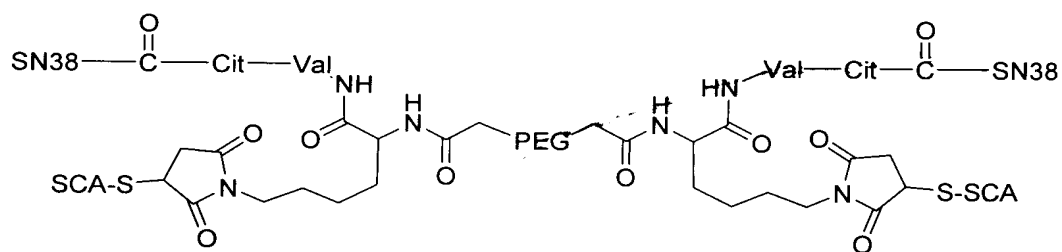
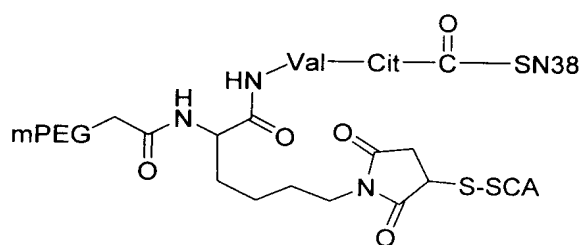
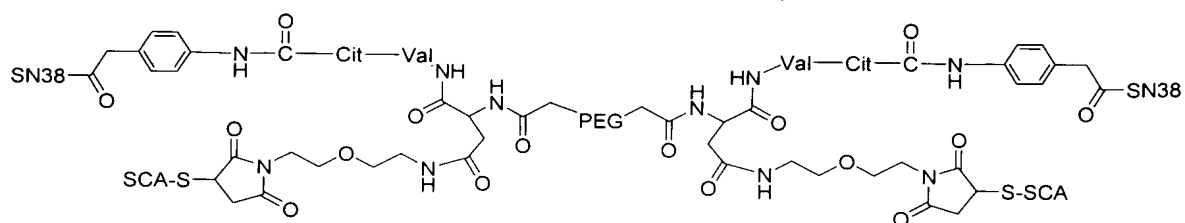
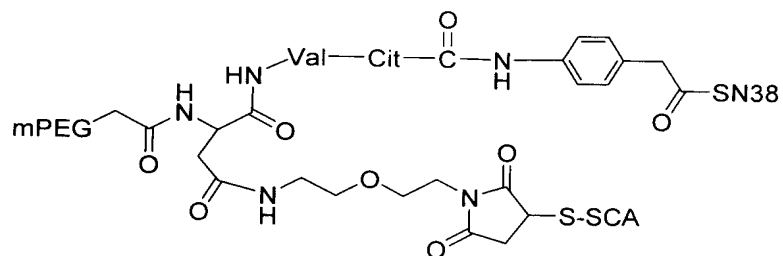
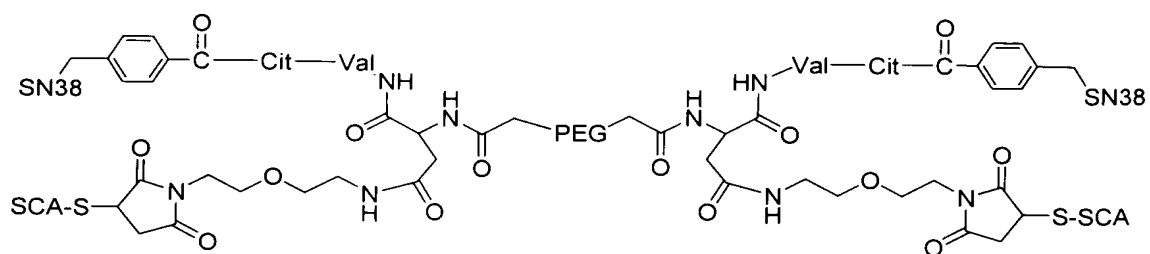


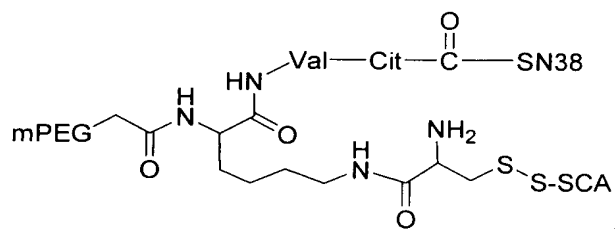
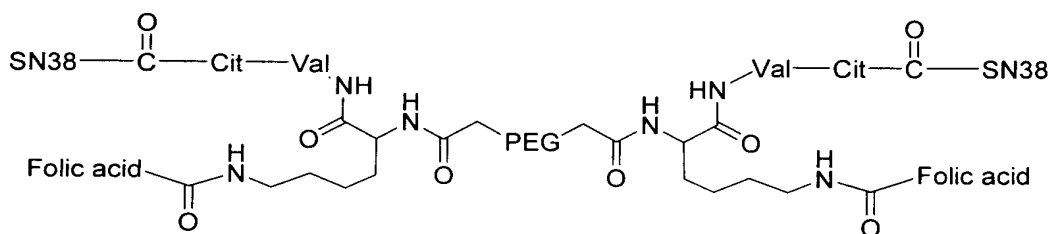
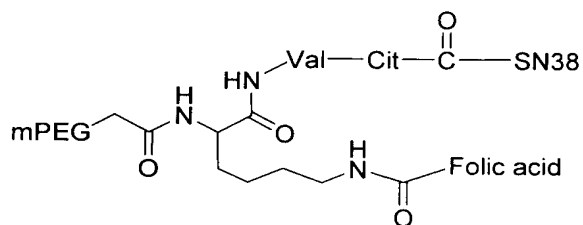
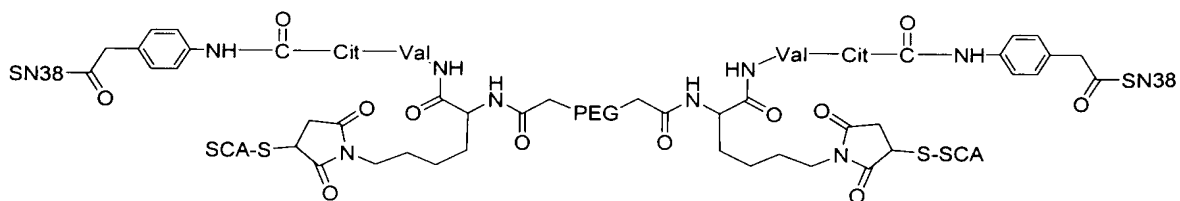
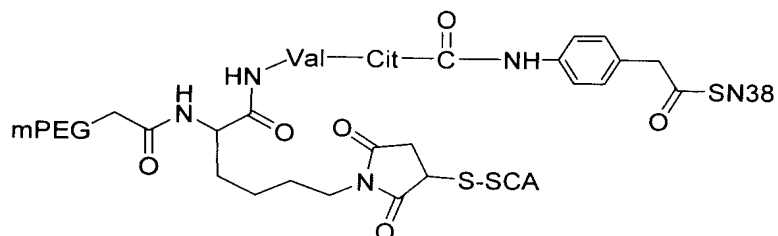
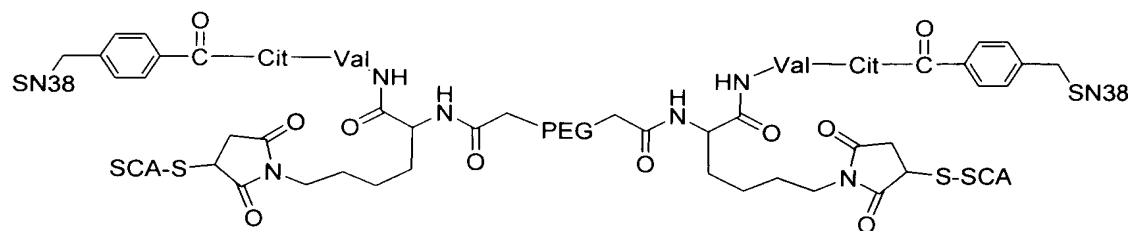


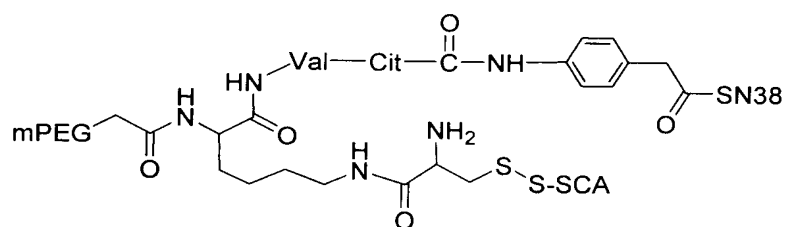
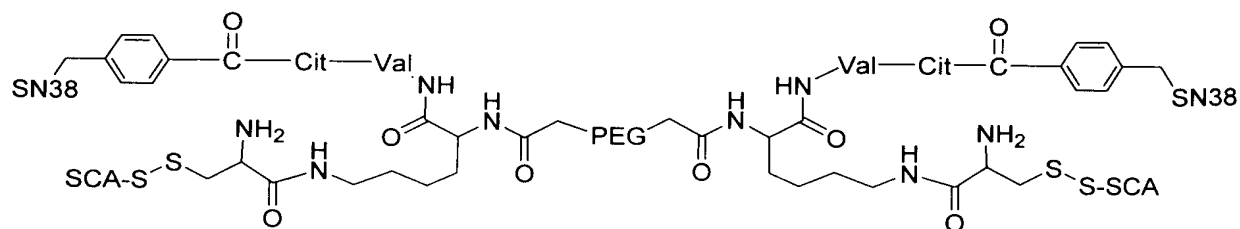
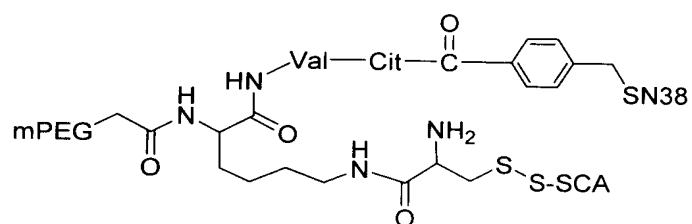
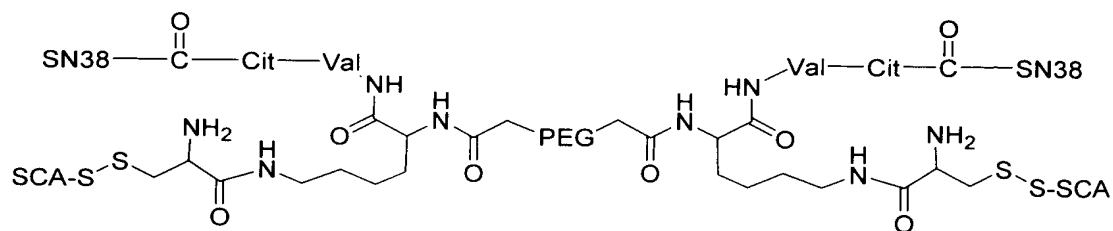
5



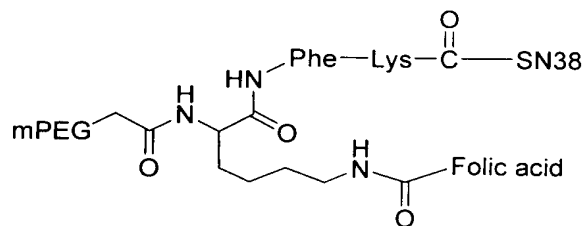
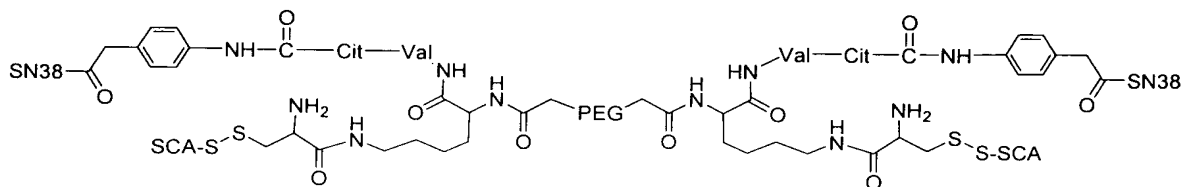




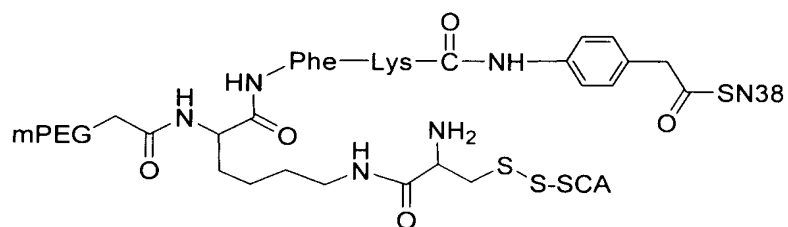
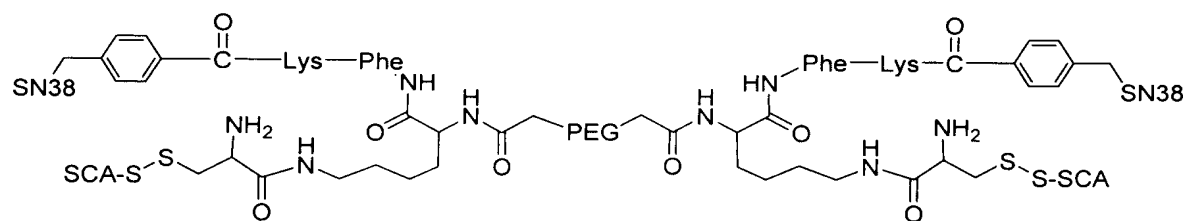
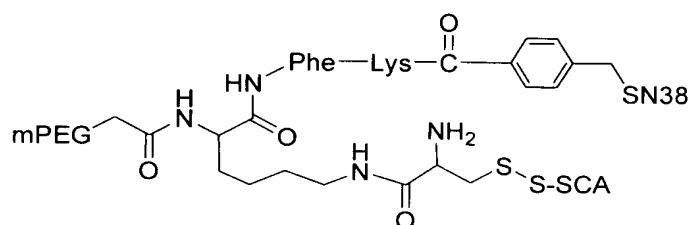
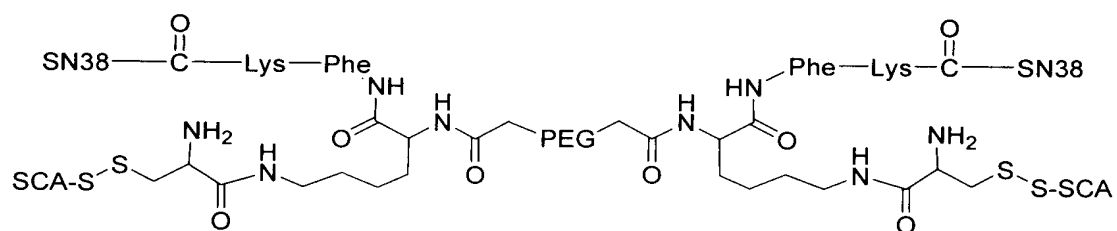
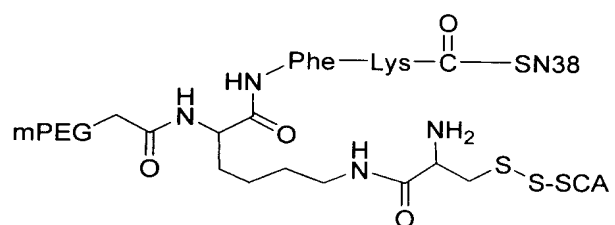


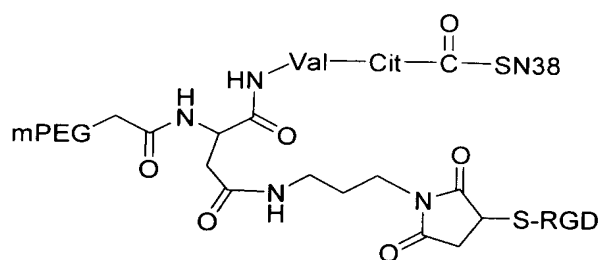
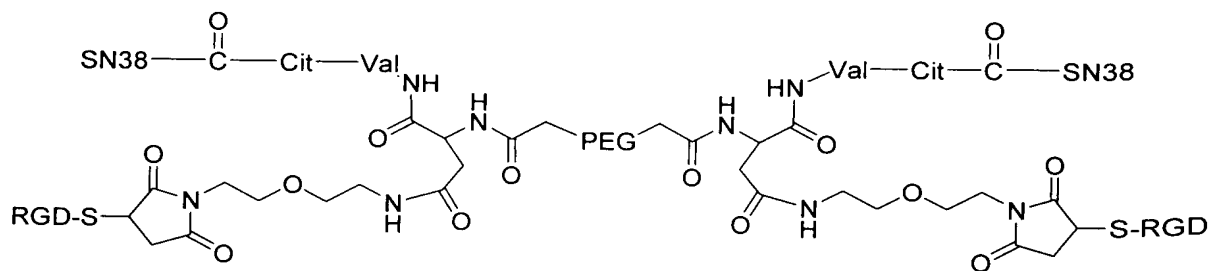
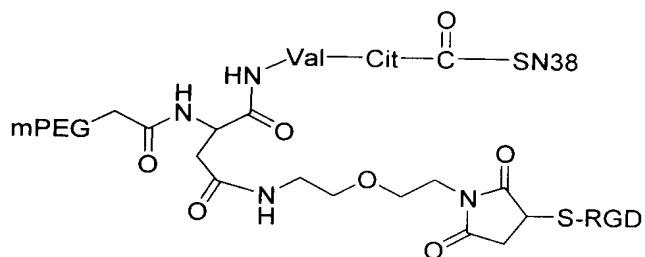


5

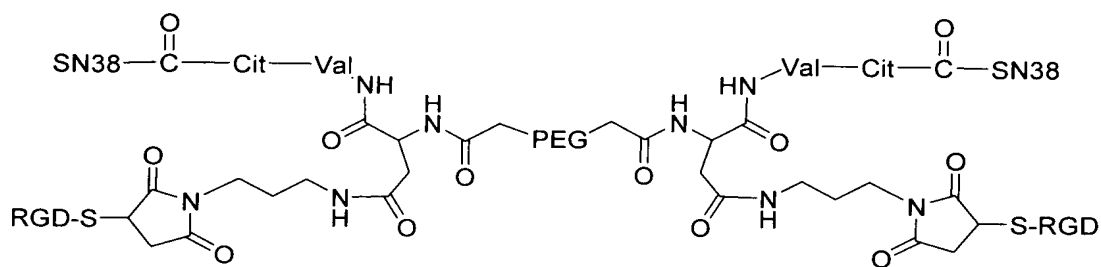


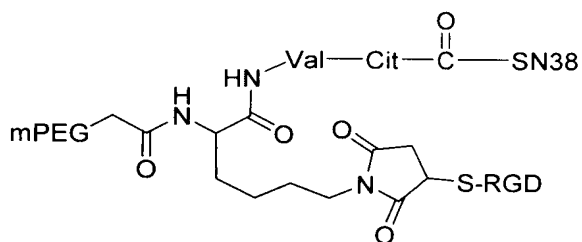
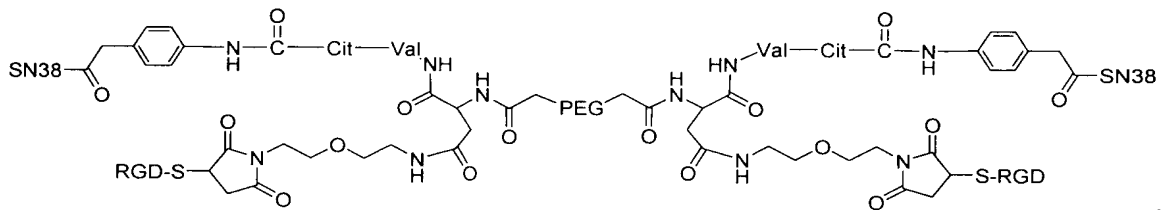
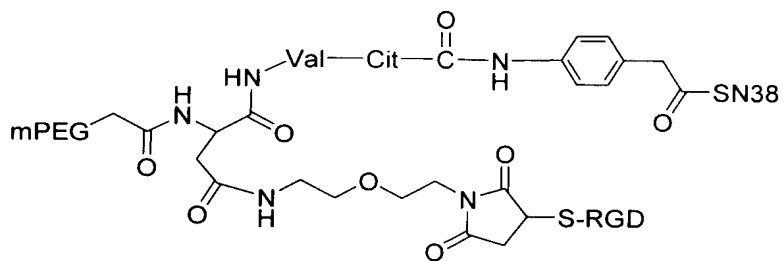
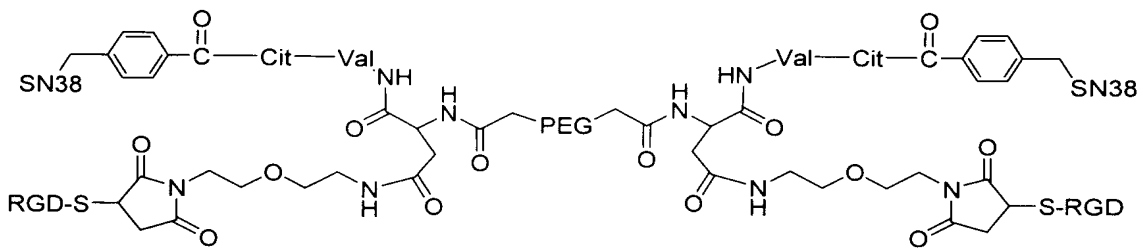
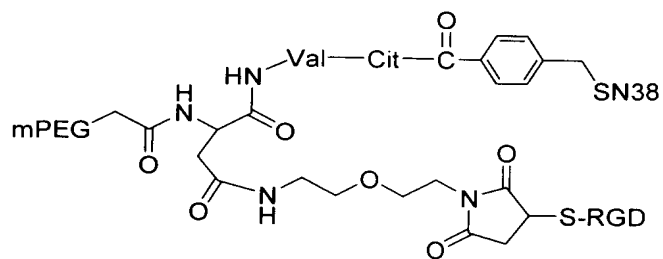
Folic acid



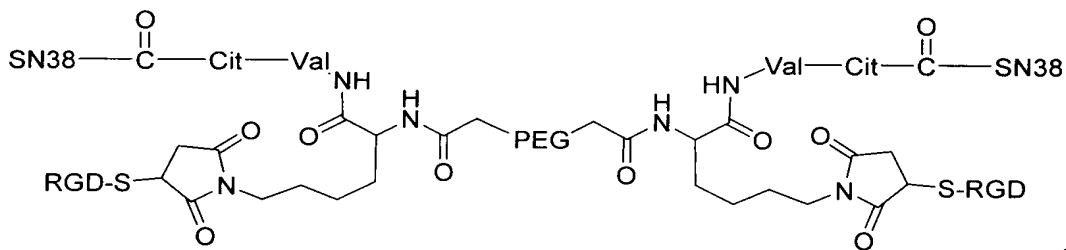


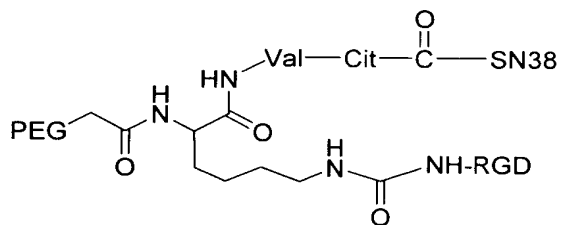
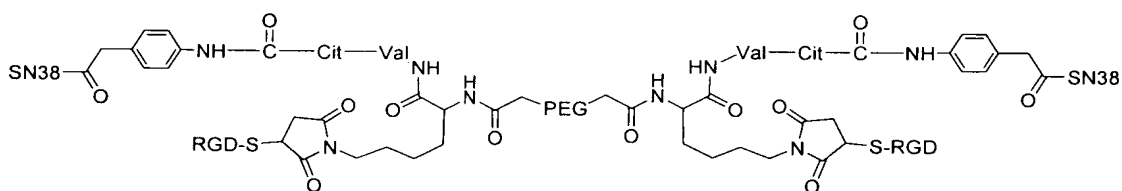
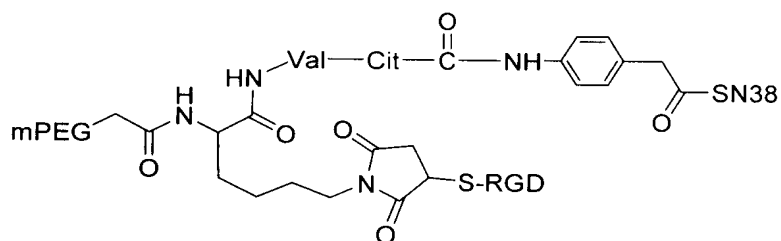
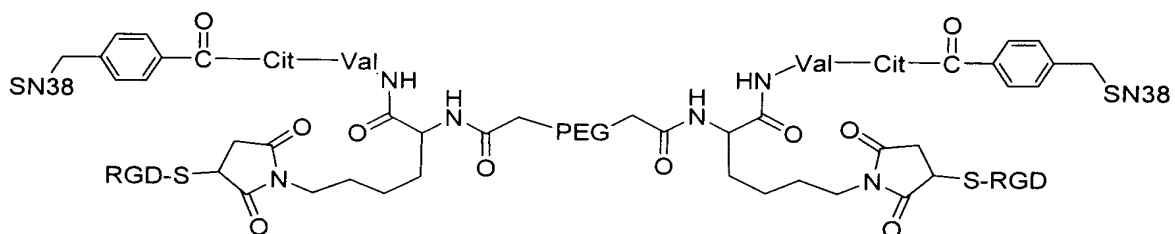
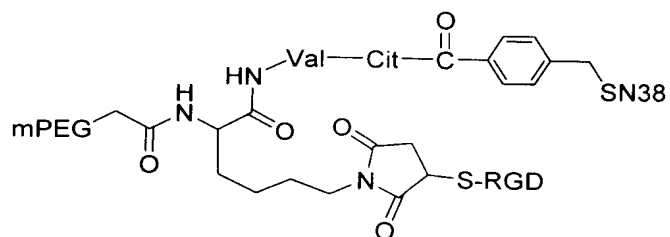
5



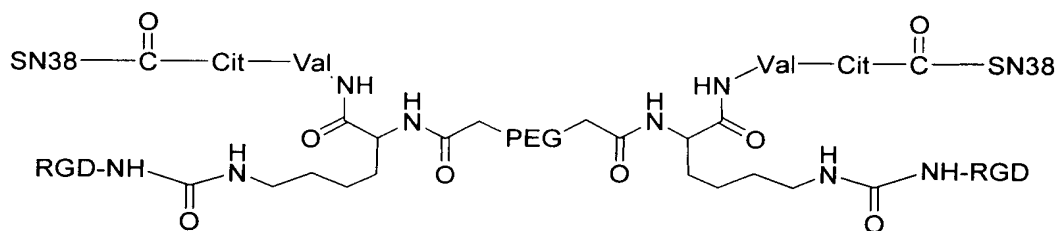


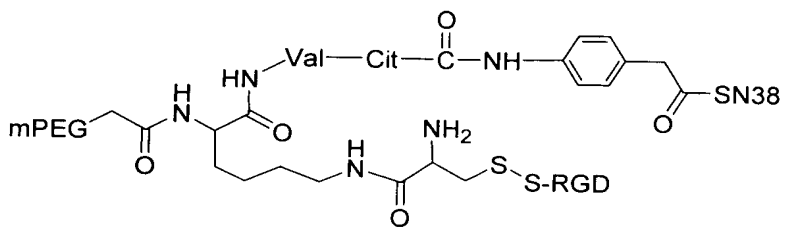
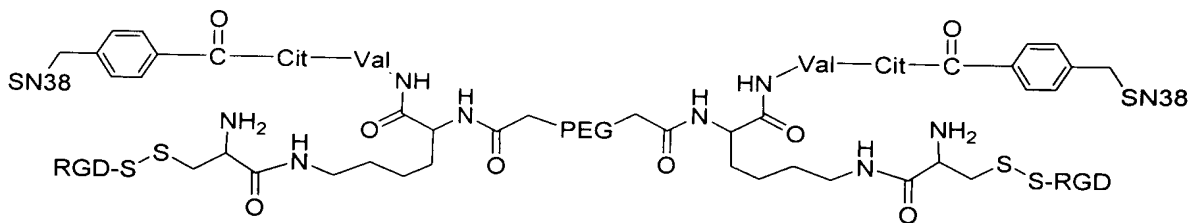
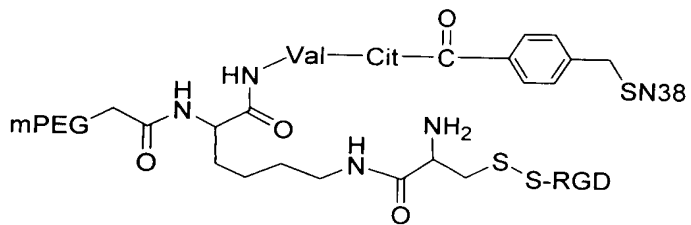
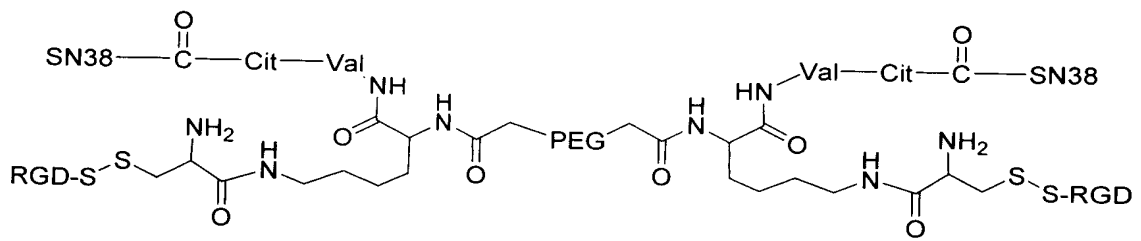
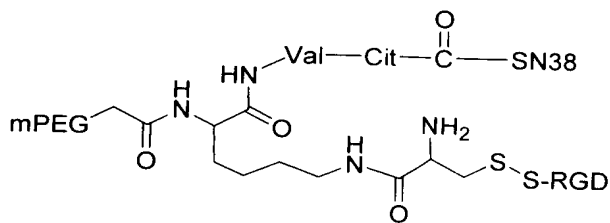
5



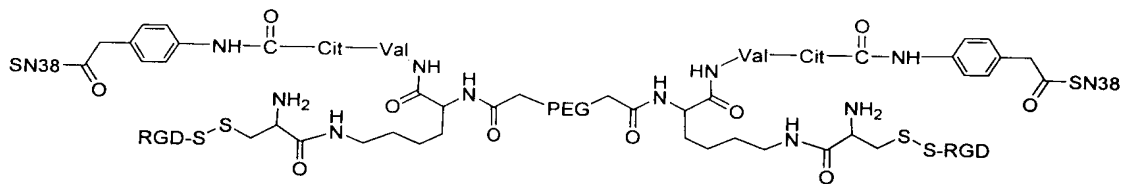


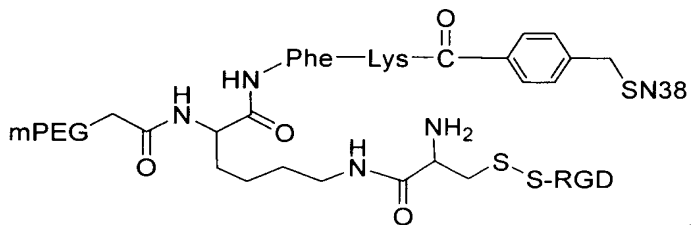
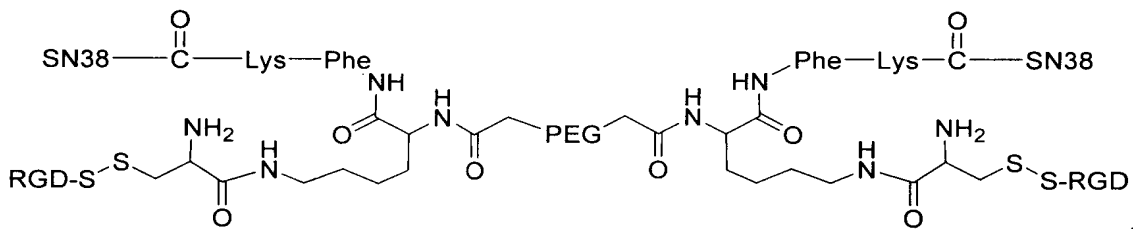
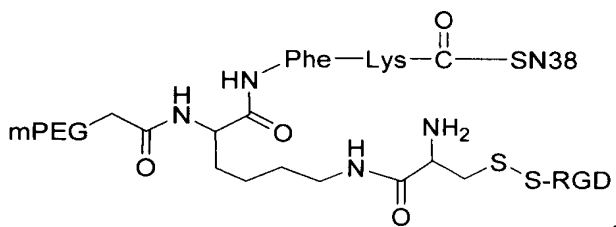
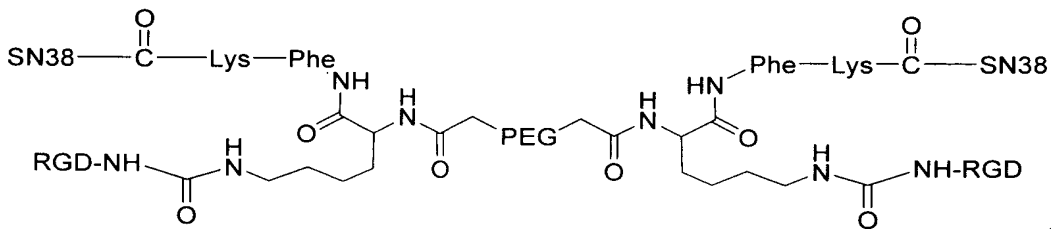
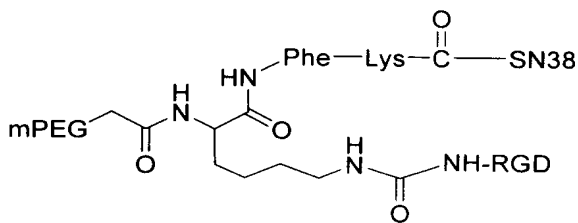
5



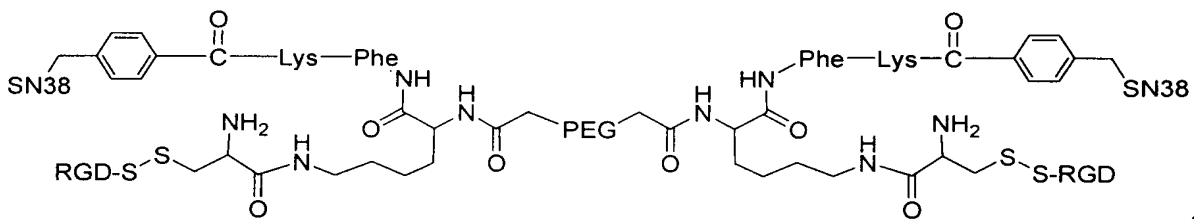


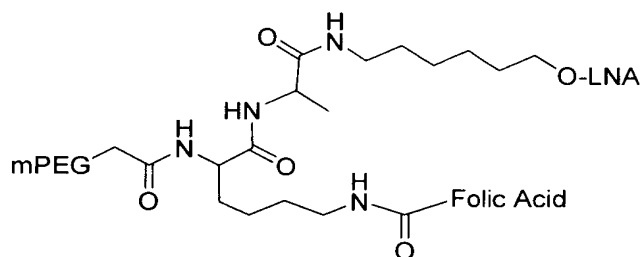
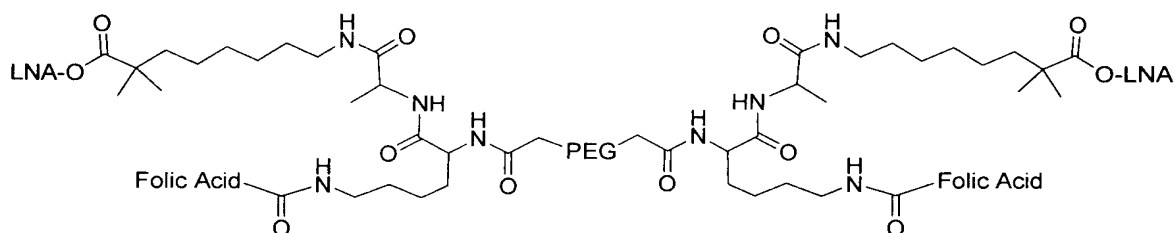
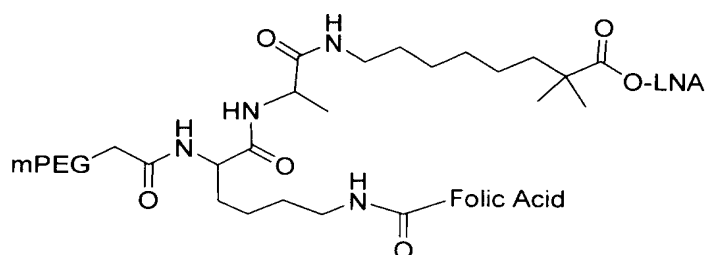
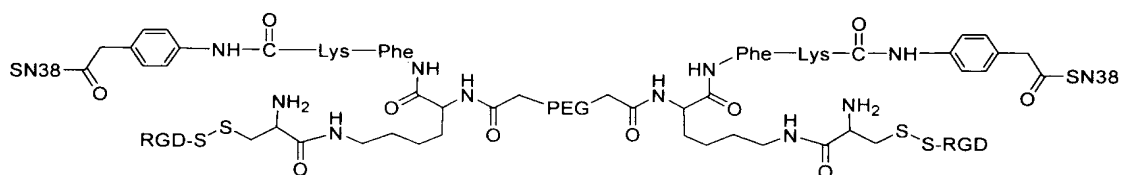
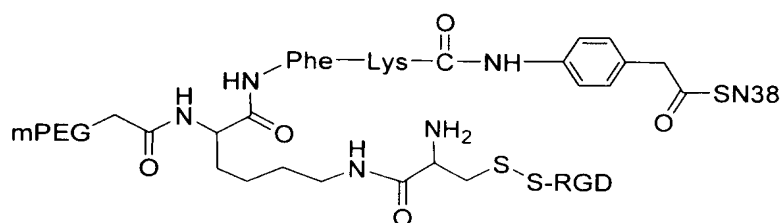
5





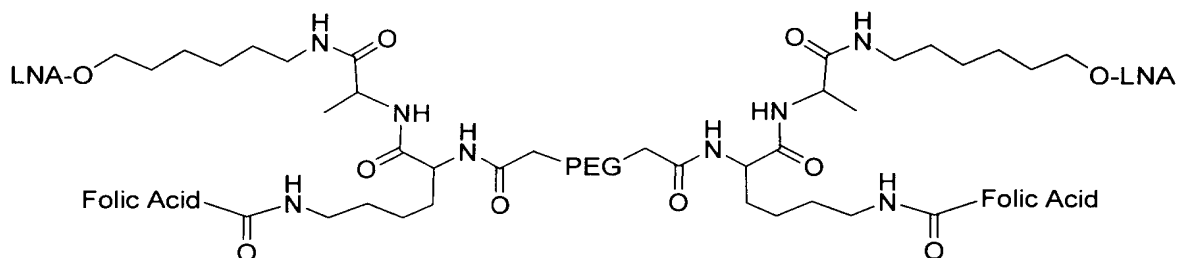
5





5

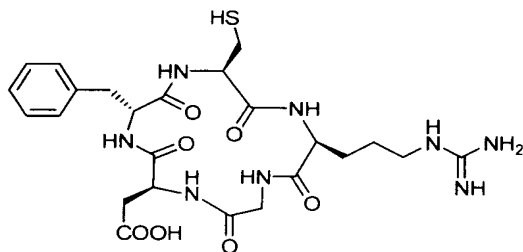
e



em que

S-SCA é um anticorpo de cadeia simples;

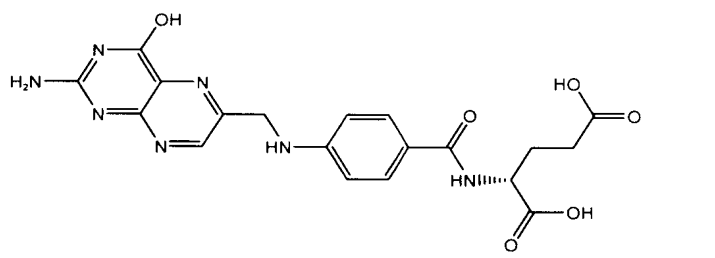
RGD é



LNA é um ácido nucléico bloqueado;

5

Ácido fólico é um resíduo de



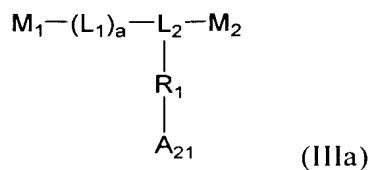
mPEG tem Fórmula: $\text{CH}_3\text{-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-}$;

PEG tem Fórmula $\text{-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-}$; e

(n) é um número inteiro positivo de cerca de 10 a cerca de 2.300.

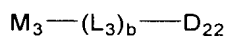
- 10 26. Método para preparação de um conjugado polimérico contendo um ligante multifuncional **caracterizado** pelo fato de compreender:

reagir um composto de Fórmula (IIIa):

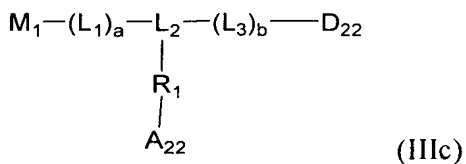


com uma porção biologicamente ativa contendo um composto tendo a Fórmula (IIIb):

15



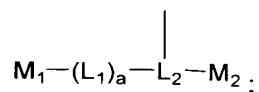
sob condições suficientes para formar o composto de Fórmula (IIIc):



em que

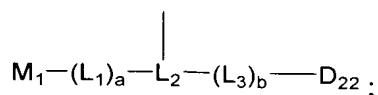
R_1 é um polímero hidrossolúvel substancialmente não antigênico;

A_{21} é um grupo de proteção ou



5

A_{22} é um grupo de proteção ou



M_1 é um grupo funcional;

D_{22} é uma porção biologicamente ativa;

M_2 é OH ou um grupo de saída;

10

M_3 é OH, NH_2 , ou SH;

L_1 é um ligante permanente ou um ligante lábil;

L_2 é um ligante multifuncional;

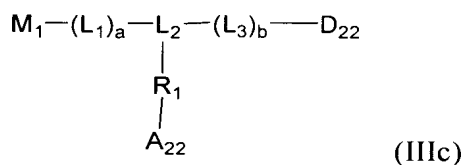
L_3 é um ligante permanente ou um ligante lábil; e

(a) e (b) são independentemente zero ou um número inteiro positivo.

15

27. Método de acordo com a reivindicação 26 **caracterizado** pelo fato ainda compreender:

reagir o composto de Fórmula (IIIc):

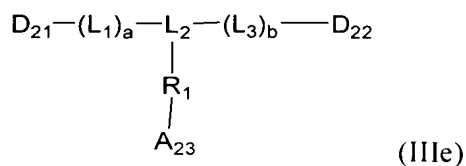


com uma porção nucleofílica tendo a Fórmula (IIId)

20

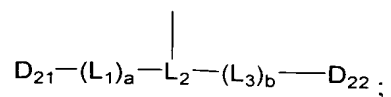


em condições suficientes para formar um composto de Fórmula (IIIe):



em que:

A_{23} é um grupo de proteção ou



M_1 é um grupo funcional;

D_{21} é uma porção direcionadora;

M_4 é OH, NH_2 , ou SH; e

5 todas as outras variáveis são como descritas na reivindicação 27.

28. Método para tratar um mamífero, **caracterizado** pelo fato de compreender administrar uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) a um paciente com necessidade deste.

29. Método para administrar polinucleotídeos a células de mamíferos, **caracterizado** pelo
 10 fato de compreender transportar uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) a uma célula que requeira tal tratamento.

FIGURA 1

Preparação de ligante PEG amida heterobifuncional (maleimida/ácido carboxílico ativado)

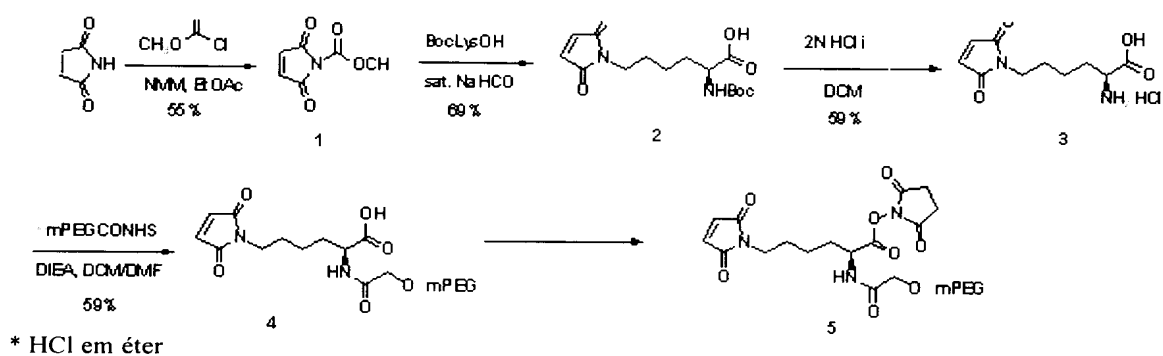


FIGURA 2

Preparação de ligante PEG carbamato heterobifuncional (maleimida/ácido carboxílico ativado)

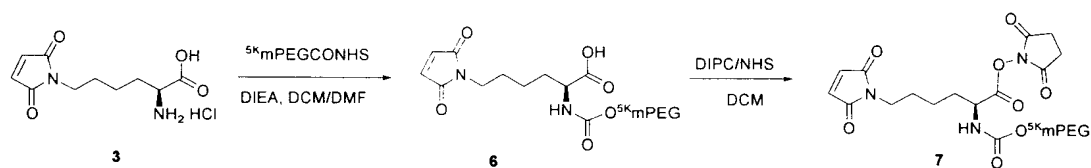
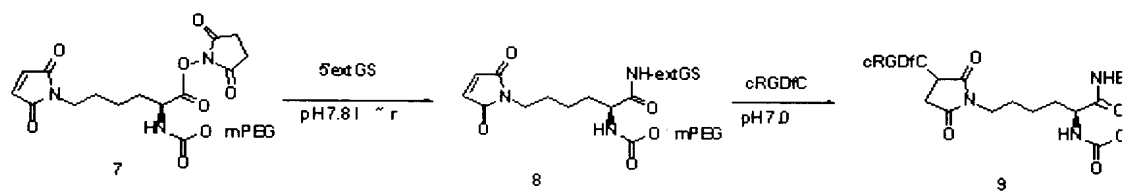


FIGURA 3**Preparação de PEG-carbamato-Lys(RGDC)-NHoligo**

Nota: pH 7,8 = tampão pH7,8
pH7,0 = tampão pH7,0

FIGURA 4

Síntese de Boc-Val-Cit-PABE-SN38 (Método A)

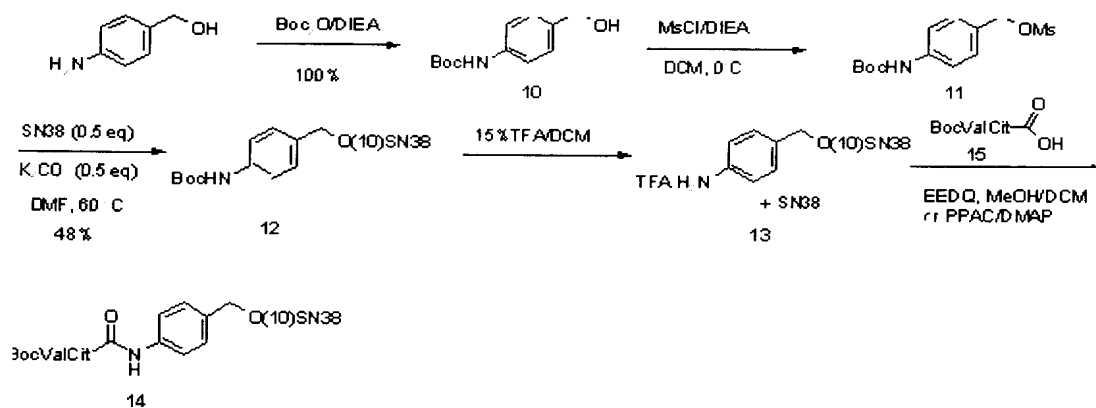


FIGURA 5

Síntese de Boc-Val-Cit-PABE-SN38 (Método B)

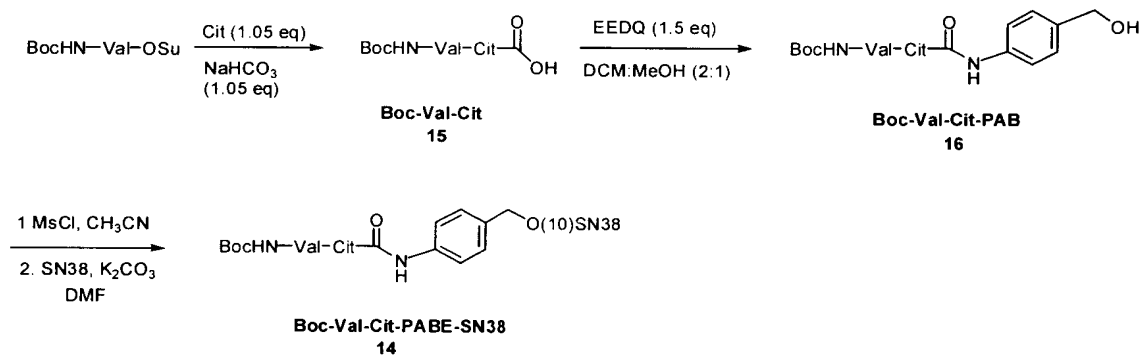


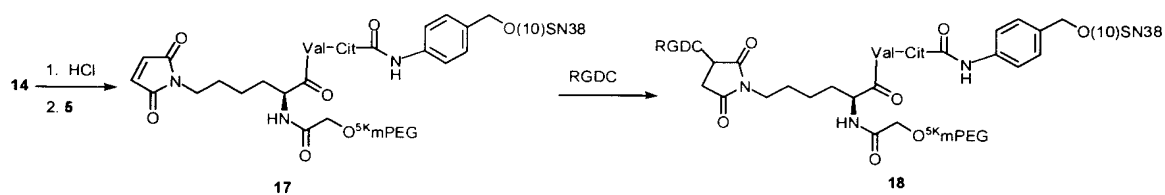
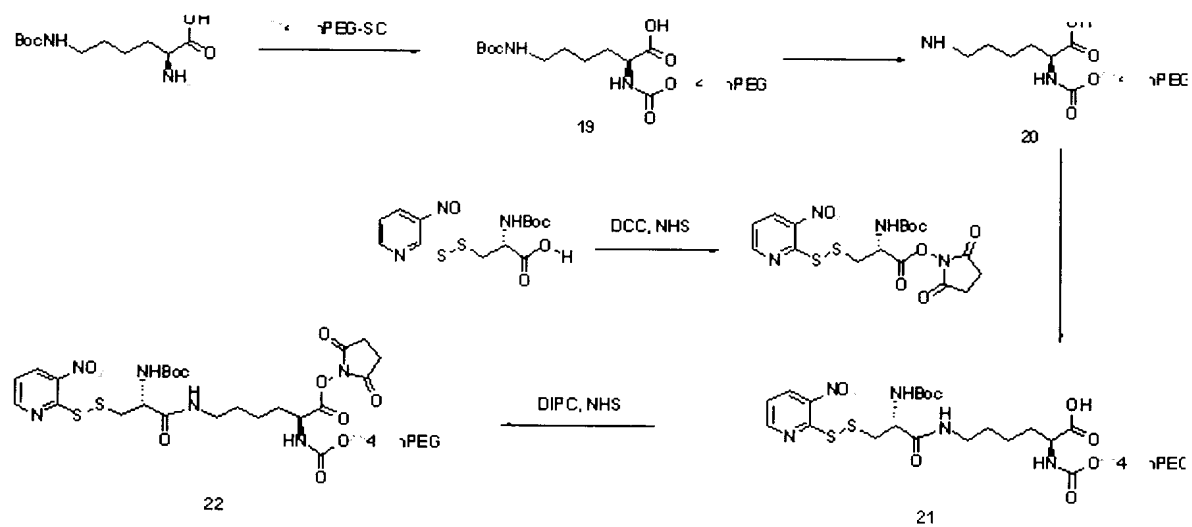
FIGURA 6**Síntese de PEG-carbamato-Lys(RGDC)-Val-Cit-PABE-SN38**

FIGURA 7

Síntese de ligante PEG carbamato heterobifuncional (NPys/ácido carboxílico ativado)



onde PEG = PEG 4 braços

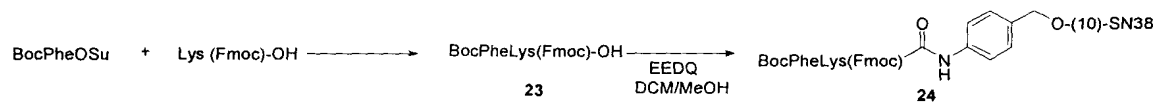
FIGURA 8**Síntese de BocPheLys(Fmoc)-NH-PABE-SN38**

FIGURA 9

Síntese de PEG-carbamato-Lys(Cys(RGDC))-Phe-Lys-PABE-SN38

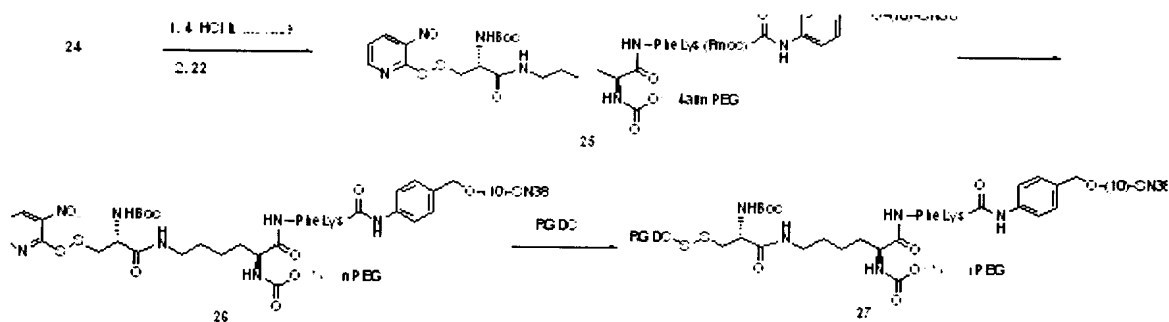
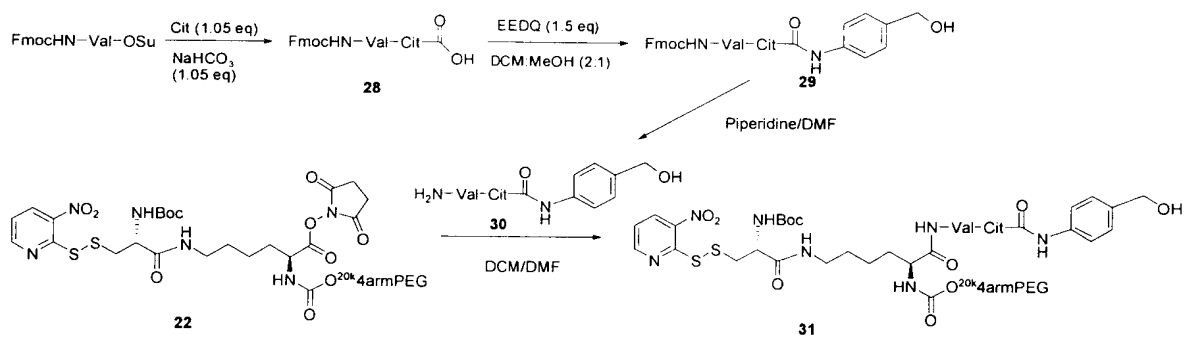


FIGURA 10

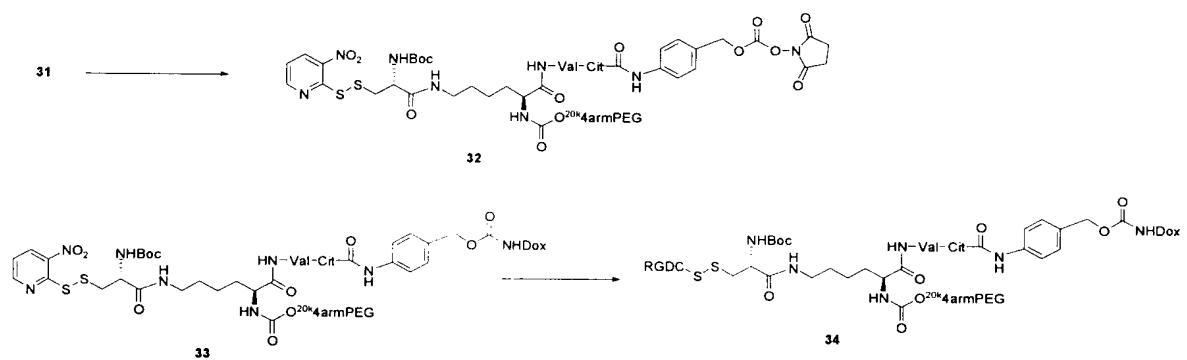
Síntese de PEG-carbamato-Lys(Cys(NPys))-Val-Cit-PAB-OH



onde: Piperidine = Piperidina
4arm PEG = PEG 4 braços

FIGURA 11

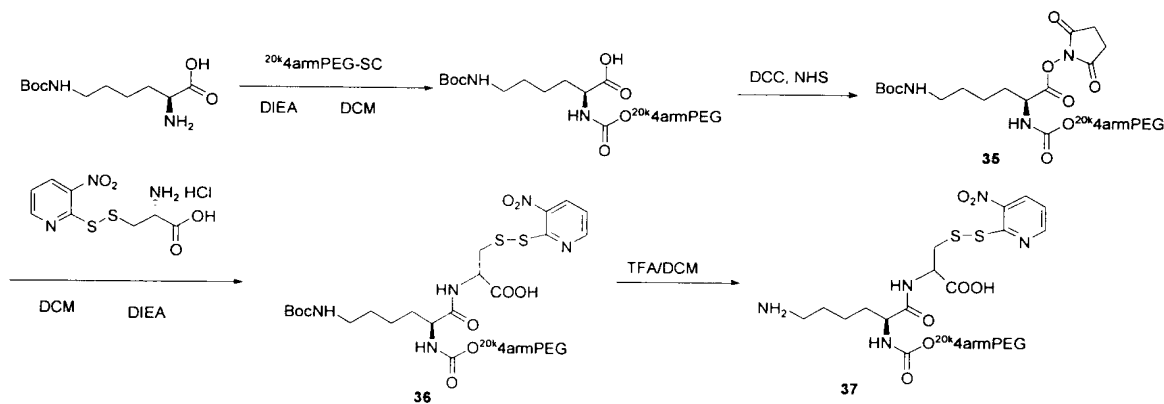
Síntese de PEG-carbamato-Lys(Cys(RGDC))-Val-Cit-PAB-Dox



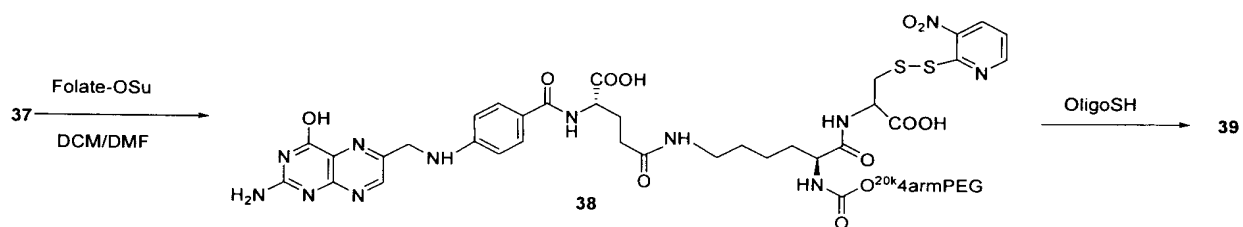
onde: 4arm PEG = PEG 4 braços

FIGURA 12

Síntese de ligante PEG carbamato heterobifuncional (NPys/amina)



onde: 4arm PEG = PEG 4 braços

FIGURA 13**Síntese de PEG-carbamato-Lys(folato)-Cys-S-Oligo**

onde: Folate = Folato
4arm PEG = PEG 4 braços

RESUMO

A presente invenção apresenta conjugados poliméricos direcionados – agentes direcionadores contendo ligantes multifuncionais. Métodos para preparar os sistemas de transporte poliméricos e métodos para tratar mamíferos utilizando os mesmos são também revelados.